



HAL
open science

Nouvelle approche dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant les poumons des patients atteints de mucoviscidose : reconstitution d'une pompe d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*

Véronique Yvette Ntsogo Enguene

► To cite this version:

Véronique Yvette Ntsogo Enguene. Nouvelle approche dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant les poumons des patients atteints de mucoviscidose : reconstitution d'une pompe d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB146 . tel-01977986

HAL Id: tel-01977986

<https://theses.hal.science/tel-01977986>

Submitted on 11 Jan 2019

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.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale

Médicament, Toxicologie, Chimie et Imagerie

Nouvelle approche dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant les poumons des patients atteints de mucoviscidose: reconstitution d'une pompe d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2016 par

Véronique Yvette NTSOGO ENGUENE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Directrice de thèse : Dr. Isabelle BROUTIN

Membres du jury :

Dr Isabelle BROUTIN Directrice de thèse

Dr. Gilles PHAN Co-encadrant

Pr. Patrice GOUET Rapporteur

Dr. Thierry JOUENNE Rapporteur

Dr. Catherine LLANES Examineur

Dr. Valérie BIOU Examineur

Thèse financée par :



Remerciements

Au terme de trois années de thèse riches en découvertes, en expériences humaines et scientifiques et surtout en émotions, je tiens à remercier Nicolas LEULLIOT, Carine TISNE et Isabelle BROUTIN qui succède à Carine TISNE pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques.

Je remercie tout particulièrement Carine TISNE d'avoir cru en moi, car ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans elle. Merci Carine d'avoir vu en moi ce que je ne voyais pas et qui était pourtant bien là.

Je remercie ma directrice de thèse Isabelle BROUTIN pour sa pédagogie, sa bonne humeur et ses conseils scientifiques. Merci pour ta patience et ton écoute, et merci pour la liberté et la confiance que tu m'as accordées pendant ma thèse. Tu as su composer avec mon côté maniaque et très perfectionniste, je sais que je peux être têtue et obstinée!!! Je te remercie également pour ta réactivité pendant la rédaction de ce manuscrit et surtout pour ton implication dans toutes les démarches administratives qui n'étaient pas toujours simples.

Toute ma gratitude et ma reconnaissance vont également à Gilles PHAN, qui a co-encadré ma thèse. Les règles administratives ne t'octroient pas le titre de directeur de thèse et ça m'attriste profondément de devoir marquer sur la couverture de cette thèse «co-encadrant» à côté de ton nom parce que tu n'as pas juste été un co-encadrant mais un vrai directeur de thèse. J'ai appris un nombre incalculable de choses à tes côtés et finalement, trois ans, c'est court...mais ça forge le caractère !!! Tu imposeras certainement des horaires restreints (ou pas) à ton prochain étudiant par ma faute mais merci d'être resté tard quand j'avais des expériences à rallonge. Merci pour ton soutien pendant ces trois ans et surtout pendant la rédaction. Ton calme et ta sérénité, et surtout ton écoute ont su me rassurer pendant les moments difficiles et les moments de doute. Je ressors grandie de ces trois années de thèse.

Je remercie également Cyril GARNIER qui aura été d'une aide précieuse. Je t'ai un peu martyrisé mais tu m'auras fait gagner un temps précieux et je t'en remercie. Quatre mains

n'auront pas été de trop pour accomplir ce travail ! Merci pour ta bonne humeur communicative.

Je ne saurai continuer sans remercier les membres de l'équipe «Shaddock» présents et passés, notamment Manuela DEZI, Bili SEIJO, Amandine VERGNAC et Houssain BENABDELHAK pour leurs conseils avisés, leurs recommandations et les échanges scientifiques que nous avons pu avoir. Je remercie tout particulièrement Martin PICARD pour la relecture de ce manuscrit mais également pour sa passion et son effervescence scientifiques communicatives. Merci pour ton écoute et tes conseils. Tu m'as montré que les limites sont des barrières que l'on se fixe et qu'il y a bien des choses à explorer au-delà ! Et pour que l'équipe «Signalisation et Transport Membranaire» soit au complet, je ne manquerai pas de citer Marie-Bernard LASCOMBE, Michèle SALEM, Arnaud DUCRUIX, Philippe BENAS, Karim HOUSSEINI et Jean-François GAUCHER. Jef, je crois que tu peux maintenant repousser ta demande de mutation en Ecosse!

Tous mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés pendant ces trois années de thèse pour leur sympathie, notamment Nathalie ULRYCK pour son extrême gentillesse, sa disponibilité et ses conseils.

Un merci tout particulier à Assia MOUHAND, Delphine ALLOUCHE, Magali BLAUD et Clément MADRU, Florian CHARDON et Lila DELBOS pour tous les bons moments passés ensemble. Merci pour votre soutien pendant les moments difficiles mais aussi pour les fous rires et les blagues quelque peu (voire très) douteuses dont l'auteur se reconnaîtra. Assia, mon séjour au laboratoire n'aurait pas été le même sans toi, il y a peu de mots pour te remercier pour tout ce que tu m'as apporté. L'aventure prend fin, mais nous aurons toujours les messages à rallonge!

Je remercie Marie José BUTEL et son équipe, notamment Laurent FERRARIS et Sophia SCHÖNHERR, pour m'avoir permis d'accéder librement à leurs paillasses (même à l'improviste !) pour les expériences de complémentation *in vivo* chez *Pseudomonas aeruginosa*. Merci à Fernande et Cavida pour leur aide précieuse au niveau de la logistique.

Je remercie également l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai pu interagir de près ou de loin : Patrick PLESIAT, Katy JEANNOT et Catherine LLANES du Laboratoire de Bactériologie à Besançon, Olivier LAMBERT et Laetitia DAURY de l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) de Bordeaux, Vladimir ADRIEN du Laboratoire d'Imagerie Paramétrique de l'École Normale Supérieure de Paris.

Je remercie du fond du cœur Alexandre CHENAL et Ana Cristina SOTOMAYOR-PEREZ qui m'ont mis le pied à l'étrier, qui m'ont fait confiance et qui m'ont incitée à faire une thèse. Merci Alex pour tout, merci de m'avoir poussée, tu y croyais bien plus que moi et tu avais raison d'y croire. Rien de tout ceci n'aurait pu être possible sans l'énorme travail que tu as accompli en amont et je ne t'en remercierai jamais assez. Esta es su trabajo, mi agradecimiento y un enorme gracias a todos Ana Cristina.

Je remercie Patrice GOUET, Thierry JOUENNE, Catherine LLANES et Valérie BIOU d'avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail.

Je remercie mes deux paires de parents, mes parents et mon oncle Paul ainsi que ma tante Claire. Vous avez tout mis en œuvre pour que j'en sois là aujourd'hui et vous m'avez inculqué les valeurs qui ont fait de moi la personne que je suis. Merci pour votre présence et votre soutien dans toutes les étapes de ma vie.

Je remercie ma sœur et mes frères pour leur soutien, leur amour, leur complicité. Malgré la distance, vous êtes présents chaque jour qui passe et vous me donnez la force d'avancer et de me surpasser. Merci particulièrement à mon petit Emmanuel (devenu grand !) qui vit mal la séparation et à ma pétillante petite Gaby (devenue grande !). J'espère vous revoir bientôt.

Merci aux femmes de caractère qui ont fait de moi la personne que je suis. À ma maman qui a toujours voulu le meilleur pour nous, qui nous a toujours poussé à aller le plus loin possible, à atteindre les sommets et qui nous en a donné les moyens, à ma marraine et tante Agathe qui a guidé mes pas dans la vie, à ma grand-mère Véronique et à mes tantes Claire et Cécile qui ont en elles cette force incroyable qui permet de tout surmonter. Merci pour votre soutien sans faille.

À ma grand-mère Albertine, la grande absente de ma vie

« Ne vous souciez pas d'être meilleur que vos contemporains ou vos prédécesseurs,
essayez seulement d'être meilleur que vous-mêmes »

William Faulkner

« Le plus grand bien que vous puissiez faire à quelqu'un n'est pas de partager vos
richesses avec lui, mais de lui révéler les siennes »

Benjamin Disraeli

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xvi
PREFACE	1

Chapitre I. INTRODUCTION

1. Les antibiotiques : classification, mode d'action et cibles	4
1.1. Les familles d'antibiotiques	5
1.2. Mode d'action et cibles	6
1.2.1. La paroi.....	7
1.2.2. La synthèse protéique.....	10
1.2.3. La synthèse et la réparation des acides nucléiques.....	12
1.2.4. Le métabolisme intermédiaire.....	13
2. La résistance aux antibiotiques chez les bactéries.	15
2.1. La résistance naturelle.....	16
2.2. La résistance acquise	18
2.2.1. La réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique	19
2.2.2. La modification de la cible	25
2.2.3. La modification ou la dégradation de l'antibiotique	28
2.3. La résistance adaptative	31
3. La résistance aux antibiotiques chez une bactérie multirésistante: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : pathogénicité et épidémiologie	35

3.2.	Les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	37
3.2.1.	La perméabilité de la membrane externe	38
3.2.2.	La résistance médiée par les enzymes d'inactivation des antibiotiques.....	42
3.2.3.	L'efflux actif.....	46
3.2.4.	Les autres systèmes de résistance.....	51
3.2.5.	Evolution de la résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
4.	Les pompes à efflux de la famille RND : structure et mécanisme.....	57
4.1.	Architecture	57
4.1.1.	Le transporteur RND	58
4.1.2.	Le canal de la membrane externe (OMF)	70
4.1.3.	L'adaptateur périplasmique MFP	78
4.1.4.	Les modulateurs des pompes à efflux	83
4.1.5.	Les pompes d'efflux non conventionnelles	85
4.2.	Assemblage de la pompe tripartite	87
4.2.1.	Le rôle de la MFP au sein du complexe.....	90
4.2.2.	L'effet de l'ouverture de l'OMF sur l'assemblage.....	94
4.2.3.	L'effet de la force protomotrice (PMF) sur l'assemblage	95
4.2.4.	Le mécanisme d'efflux	96
4.2.5.	Les modèles d'assemblage de la pompe tripartite	97
5.	Stratégies d'étude des pompes à efflux chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
5.1.	Etude de l'effet de l'efflux sur l'activité des antibiotiques.....	101
5.2.	Etude de l'efflux <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	105
5.3.	Etude des interactions au sein de la pompe	107
5.3.1.	Etude des interactions avec les substrats.....	108
5.3.2.	Etude des interactions entre les partenaires de la pompe	109

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES

1.	Biologie Moléculaire	112
1.1.	Souches utilisées.....	112
1.2.	Plasmides utilisés.....	114

1.2.1.	Expression des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	114
1.2.2.	Complémentation <i>in vivo</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	117
1.3.	Clonage des gènes OprM, MexX et MexY dans des vecteurs d'expression	119
1.3.1.	Clonage du mutant ouvert d'OprM dans le vecteur d'expression pBAD33-GFPuv	119
1.3.2.	Clonage des gènes MexX et MexY dans les vecteurs d'expression pASK-IBA63 et pASK-IBA2.....	121
1.3.3.	Clonage de MexY dans le vecteur d'expression pET-11a	122
1.3.4.	Clonage d'OprM et de ses mutants dans le vecteur pUCP24	123
2.	Expression des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	128
2.1.	Production des protéines recombinantes	128
2.1.1.	Production des protéines OMF (OprM-2mut, OprM-4mut et OprN).....	128
2.1.2.	Production des protéines MFP (MexA, MexX et MexE)	128
2.1.3.	Production des protéines RND (MexB et MexY).....	129
2.2.	Purification des protéines recombinantes	129
2.2.1.	Purification des protéines OMF (OprM-2mut, OprM-4mut et OprN).....	129
2.2.2.	Purification des protéines MFP (MexA, MexX et MexE).....	132
2.2.3.	Purification des protéines RND (MexB et MexY).....	133
3.	Cristallogénèse et Cristallographie	134
3.1.	Cristallogénèse et cristallisation des protéines OMF	134
3.2.	Cristallographie.....	136
3.2.1.	Structures des mutants d'OprM : Collecte et traitement des données, construction du modèle et validation de la structure	136
3.2.2.	Structure d'OprN : collecte et traitement des données, construction du modèle et validation de la structure	137
4.	Modélisation de mutants cliniques de la β-lactamase AmpC	138
5.	Etude de la sensibilité aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> par complémentation <i>in vivo</i>	139
5.1.	Antibiogramme : principe, intérêt et applications	139
5.2.	En pratique.....	141
5.2.1.	Préparation des bactéries électrocompétentes	141
5.2.2.	Préparation de l'inoculum	141
5.2.3.	Réalisation des antibiogrammes.....	142

5.2.4.	Localisation cellulaire des mutants d'OprM chez <i>P. aeruginosa</i>	146
6.	Etude des interactions OMF-MFP par BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis)	148
6.1.	Le BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis) : principe et contexte	148
6.2.	Préparation des échantillons	149
6.3.	Préparation du gel gradient et migration.....	149

Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSION

1.	La pompe MexEF-OprN et la résistance aux fluoroquinolones : Caractérisation structurale et fonctionnelle du canal OprN	151
1.1.	Production et cristallisation du canal OprN	152
1.1.1.	Expression et purification	152
1.1.2.	Cristallisation.....	154
1.2.	Résolution de la structure cristallographique du canal OprN	156
1.3.	Analyse structurale	160
1.3.1.	Vue d'ensemble	160
1.3.1.1.	Le domaine β	161
1.3.1.2.	Le domaine α	164
1.3.2.	Les extrémités extracellulaire et périplasmique du canal OprN	166
1.3.3.	Comparaison du domaine équatorial des OMF	172
1.3.4.	Propriétés électrostatiques des OMF	175
1.3.5.	Acylation de l'extrémité N-terminale	177
	ARTICLE #1: New OprM structure highlighting the nature of the N-terminal anchor	183
2.	Mécanisme d'ouverture des OMF : caractérisation structurale d'un mutant du canal OprM ouvert dans un état intermédiaire	197
2.1.	Expression, purification et cristallisation des mutants du canal OprM	198
2.1.1.	Expression et purification	198
2.1.2.	Cristallisation.....	201
2.2.	Résolution de la structure cristallographique du mutant 4mut du canal OprM.....	203
2.3.	Analyse structurale	206
2.3.1.	Réarrangement structural des hélices du domaine coiled-coil	206

2.3.2.	La triade Leucine, une clé de voûte conservée.....	209
3.	Implication de l'ouverture du canal dans l'assemblage et le fonctionnement de la pompe : caractérisation fonctionnelle de mutants ouverts du canal OprM par complémentation <i>in vivo</i>	212
3.1.	Réalisation des antibiogrammes et évaluation de la résistance aux antibiotiques	213
3.2.	Détermination des CMI	219
4.	Etude de la formation des complexes bipartites OMF-MFP et de l'assemblage de la pompe tripartite MexA-MexB-OprM	225
4.1.	Etude de l'interaction OMF-MFP par BN-PAGE.....	226
4.1.1.	Le BN-PAGE	226
4.1.2.	Caractérisation des complexes	227
4.2.	Reconstitution de la pompe tripartite MexA-MexB-OprM en protéoliposomes....	234
	ARTICLE #2: Catch me if you can: a biotinylated proteoliposome affinity assay for the investigation of assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	239
5.	Spécificité de la résistance aux aminoglycosides chez <i>P. aeruginosa</i>: Caractérisation structurale et fonctionnelle de la pompe MexX – MexY	247
5.1.	Production de MexY à partir du vecteur d'expression pASK-IBA2.....	247
5.1.1.	Expression	247
5.1.2.	Purification.....	248
5.2.	Production de MexY à partir du vecteur d'expression pET-11a.....	252
5.2.1.	Expression	252
5.2.2.	Purification et essais de cristallisation.....	254
6.	Modélisation des mutants cliniques de la β-lactamase AmpC	257
	ARTICLE #3: Mutations in β-Lactamase AmpC Increase Resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins	262
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	270
	BIBLIOGRAPHIE	273

Liste des abréviations

AAC : **A**minoglycoside **AC**étyltransférase

ABC : **A**TP-**B**inding **C**assette

Acr : **A**criflavine

ANT : **A**minoglycoside **N**ucléotidyl**T**ransférases

APH : **A**minoglycoside **Ph**osphorylase

Ara : **A**rabinose

BAM : **β** -barrel **A**ssembly **M**achinery, système d'assemblage des protéines de la membrane externe organisées en feuillet β

BET : **B**romure d'**ET**hidium

BLSE : **β** -**L**actamases à **S**pectre **E**tendu

β OG : **O**ctyl- **β** -**G**lucoside

CCCP : **C**arbonyl **C**yanide m-**C**hloro**P**henylhydrazone

CMI : **C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice

CTX : **C**éfo**TaX**ime

DDM : **D**o**D**écyl- **β** -**M**altoside

E. coli : *Escherichia coli*

EARSS : **E**uropean **A**ntimicrobial **R**esistance **S**urveillance **S**ystem, Système Européen de surveillance de la résistance aux antibiotiques

ESAC : **E**xtended **S**pectrum **A**mp**C** β -lactamase, β -lactamase AmpC à spectre étendu

FTM : **F**ast and **T**ransient **M**echanism, réponse rapide et transitoire

IMP : **IMiP**énème

InVS : **I**nstitut **N**ational de **V**eille **S**anitaire

ITC : **I**sothermal **T**itration **C**alorimetry, titration calorimétrique

KPC : **K**lebsiella **p**neumoniae **C**arbapénémase

L-Ara4N : 4-amino-4-desoxy-L-arabinose

Lol : **L**ipoprotein **O**uter membrane **L**ocalisation, système de translocation des lipoprotéines de la membrane externe

LPS : **L**ipo**P**oly**S**accharide

Mar : **M**ultiple **A**ntibiotic **R**esistance

MATE : **M**ultidrug **A**nd **T**oxic compound **E**xtrusion

Mex : **M**ultidrug **E**fflu**X** pump

MFP : **M**embrane **F**usion **P**rotein

MFS : **M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily

MP : **M**embrane **P**roximal, domaine proximal des protéines MFPs

Mtr : **M**ultiple **T**ransferable **R**esistance

NAG : **N**-**A**cétyl**G**lucosamine

NAM : Acide **N**-**A**cétyl**M**uramique

NDM : **N**ew **D**ehli **M**étallo- β -lactamase

OMF : **O**uter **M**embrane **F**actor

Oqx : **O**la**Q**uindo**X**

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PACE : **P**roteobacterial **A**ntimicrobial **C**ompound **E**fflux

PA β N : **P**hénylalanine-**A**rginine **β** -**N**aphthylamide

pEtN : **P**hospho**E**thanolamine

PBP : **P**enicillin- **B**inding **P**rotein

PLP : **P**rotéines **L**iant la **P**énicilline

PMF : **P**roton **M**otrice **F**orce, force protomotrice

RBS : **R**ibosome **B**inding **S**ite, site de fixation des ribosomes

RND : **R**esistance-**N**odulation-**D**ivision

SARM : souche de *Staphylococcus aureus* **R**ésistante à la **M**éthicilline

SCCmec : **S**taphylococcal **C**assette **C**hromosome **mec**

SD : **S**hine-**D**algarno

SMR : **S**mall **M**ultidrug **R**esistance

SPR : **S**urface **P**lasmon **R**esonance, résonance plasmonique de surface

SSM : **S**low and **S**table **M**echanism, réponse lente et stable

Tet : **T**étracycline

RND : **R**esistance- **N**odulation-**D**ivision

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie de la découverte des différentes classes d'antibiotiques..	1
Figure 2 : Développement des antibiotiques et évolution de la résistance.....	2
Figure 3 : Structures de quelques familles d'antibiotiques.....	6
Figure 4 : Structure et composition des membranes des bactéries Gram positif et Gram Négatif.....	8
Figure 5 : Synthèse du peptidoglycane et cibles des antibiotiques.	9
Figure 6 : Etapes de la biosynthèse des protéines et cibles des antibiotiques.....	11
Figure 7 : Inhibition de la réplication des acides nucléiques.	13
Figure 8 : Métabolisme de l'acide folique.....	14
Figure 9 : Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries.	15
Figure 10 : Mécanismes de résistance naturelle.....	16
Figure 11 : Structure de quelques glycopeptides.....	17
Figure 12 : Structures d'une porine monomérique (OmpG) et d'une porine trimérique (OmpF) d' <i>E. coli</i>	20
Figure 13 : Structure d'un monomère de la porine OmpF d' <i>Escherichia coli</i> en complexe avec différentes β -lactamines	21
Figure 14 : Régulation de l'expression des pompes à efflux.....	23
Figure 15 : Les différents systèmes d'efflux bactériens.	25
Figure 16 : Représentation du site actif de l'ADN gyrase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en complexe avec une quinolone..	26
Figure 17 : Modification du LPS et résistance aux polymyxines.	27
Figure 18 : Mécanisme d'action général des Sérine et des métallo- β -lactamases.....	29
Figure 19 : Acquisition continue et discontinue de la résistance.....	32
Figure 20 : Les mécanismes impliqués dans la résistance adaptative.	34
Figure 21 : Bactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivées pendant trois jours dans l'espace	35
Figure 22 : Résistance croisée et co-résistance à différents antibiotiques chez des isolats cliniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistants à la pipéracilline (PRPA).....	37
Figure 23 : Comparaison de la taille des pores (vue extracellulaire) de deux porines sélectives (OprD et OprK de <i>P. aeruginosa</i>) et de deux porines non sélectives (OmpG et OmpF d' <i>E. coli</i>).....	39
Figure 24 : Modèles de co-régulation de l'expression de la pompe à efflux MexEF-OprN et de la porine OprD chez <i>P. aeruginosa</i>	40
Figure 25 : Exemples de mécanismes impliqués dans la résistance liée à des modifications d'expression des porines.....	41

Figure 26 : Structure de la β -lactamase AmpC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en complexe avec un inhibiteur.	44
Figure 27 : Illustration des sites modifiés par les enzymes de modification des aminoglycosides.	45
Figure 28 : Voies de régulation de l'expression des pompes à efflux et de la porine OprD chez <i>P. aeruginosa</i>	50
Figure 29 : Régulation des gènes modificateurs du LPS impliqués dans la résistance aux polymyxines.	53
Figure 30 : Distribution de la fréquence des mutations chez 62 isolats cliniques retrouvés chez des patients atteints d'infections chroniques.	55
Figure 31 : Organisation des pompes à efflux tripartite de la famille RND.	57
Figure 32 : Les opérons codant pour les pompes à efflux chez <i>P. aeruginosa</i>	58
Figure 33 : Structure du trimère (A) et topologie d'un monomère (B) d'AcrB.	60
Figure 34 : Vue transversale du domaine du pore d'AcrB (vue de dessus, depuis le domaine d'amarrage).	61
Figure 35 : Vue transversale du domaine du pore d'AcrB (depuis le domaine d'amarrage) en complexe avec différents antibiotiques.	62
Figure 36 : Les différentes voies d'entrée possibles des substrats au sein du transporteur trimérique AcrB.	64
Figure 37 : Vue partielle de la crevasse de l'un des monomères d'AcrB.	65
Figure 38 : Mécanisme d'efflux par rotation péristaltique à travers le complexe tripartite AcrAB-TolC.	67
Figure 39 : Les différentes conformations adoptées par les monomères d'AcrB au cours de l'efflux.	68
Figure 40 : Changements conformationnels impliqués dans le transfert de protons au cours de l'efflux vus depuis le domaine transmembranaire (A) ou depuis le périplasma (B).	69
Figure 41 : Structure du trimère (A) et topologie d'un monomère (B) de TolC.	71
Figure 42 : Anneau anionique de TolC.	72
Figure 43 : Comparaison des extrémités périplasmiques de TolC (A) et de MtrE (B).	74
Figure 44 : Systèmes de sécrétion, de translocation et de repliement impliqués dans l'adressage des protéines à la membrane externe.	76
Figure 45 : Les trois étapes de l'acylation des lipoprotéines.	77
Figure 46 : Structure et topologie d'une MFP entière.	79
Figure 47 : Empilement cristallin de MexA.	80
Figure 48 : Exemples de protéines de la famille des MFPs.	82
Figure 49 : Structure du transporteur RND AcrB en complexe avec AcrZ.	84
Figure 50 : Modèle de la pompe d'efflux CusCBA.	85

Figure 51 : Modèles de trois pompes d'efflux à quatre composantes.	87
Figure 52 : Structures individuelles des composants OMF (ToIC), MFP (AcrA) et RND (AcrB) et du modulateur AcrZ (A) et modèle de la pompe assemblée (B) reconstituée à partir de la structure obtenue par microscopie électronique (C).	89
Figure 53 : Comparaison structurale du domaine coiled-coil de l'OMF ToIC (A) et du domaine α de la MFP ZneB (B).	91
Figure 54 : Structure du complexe bipartite CusBA.	92
Figure 55 : Mécanisme d'assemblage et d'efflux séquentiel de la pompe MtrCDE.	97
Figure 56 : Modèles d'assemblage de la pompe tripartite.	98
Figure 57 : Structures d'une quinolone fluorée (fluoroquinolone) (A) et d'une quinolone non fluorée (B).	102
Figure 58 : Structures de deux carbapénèmes.	104
Figure 59 : Représentation schématique de l'efflux à travers la pompe assemblée <i>in vitro</i>	107
Figure 60 : Cartes des plasmides d'expression utilisés au cours des différents clonages.	115
Figure 61 : Carte du plasmide pME6001.	117
Figure 62 : Carte du plasmide pUCP24.	118
Figure 63 : Résumé de la procédure de clonage utilisée pour MexY dans le vecteur pET-11a (adapté de Mokhonova et al. 2005).	123
Figure 64 : Outils et techniques utilisés pour le criblage des conditions de cristallisation.	135
Figure 65 : Interprétation des valeurs de CMI et des diamètres d'inhibition.	141
Figure 66 : Dispenseur d'antibiotiques (16-disk Dispenser, Biorad) et répartition des disques d'antibiotiques sur la gélose	143
Figure 67 : Ensemencement de Steers (a). AntibioGramme par dilution en milieu gélosé (b).	144
Figure 68 : AntibioGrammes par diffusion en gradient de concentration.	145
Figure 69 : Analyse des fractions d'OprN éluées après chromatographie d'exclusion stérique.	153
Figure 70 : Cristaux d'OprN obtenus au bout d'une semaine à 18°C (à 12 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après optimisation manuelle à partir de la condition 3.	155
Figure 71 : Cliché de diffraction d'un cristal d'OprN diffractant à 2.3 Å de résolution.	156
Figure 72 : Diagramme de Ramachandran de la structure cristallographique d'OprN, résolue dans le groupe d'espace I4, obtenu à l'aide du module de validation du programme COOT.	160
Figure 73 : Structures et architecture générale des OMF.	161
Figure 74 : Les molécules de détergent présentes au niveau du domaine β transmembranaire d'OprN.	162
Figure 75 : Empilement de type I.	163
Figure 76 : Empilement cristallin de type I d'OprM (à gauche) et d'OprN (à droite).	163

Figure 77 : Empilement de type II.	164
Figure 78 : Empilement cristallin de type II d'OprN.	165
Figure 79 : La vue élargie de l'extrémité C-terminale d'un monomère montre la présence d'une molécule de détergent (en jaune) piégée par l'étiquette poly-histidine (panneau supérieur).	166
Figure 80 : Représentation des extrémités extracellulaire (EE) et périplasmique (EP) d'OprN (A), de TolC (B) et de MtrE (C).	167
Figure 81 : Représentations des extrémités de différentes OMF.	169
Figure 82 : Représentation du triplet de résidus hydrophobes conservés de la constriction périplasmique d'OprN, OprM et de TolC.	171
Figure 83 : Représentation des résidus qui stabilisent la conformation fermée chez OprN au sein d'un monomère (A) et entre deux monomères, représentés en marron et en bleu (B).	171
Figure 84 : Vue de la constriction périplasmique d'OprN.	172
Figure 85 : Alignement multiple des séquences participant à la bouée équatoriale (A : N-terminus, B : centre, C : C-terminus) des protéines OprN, OprM et TolC.	173
Figure 86 : Superposition des extrémités N-terminale (A), C-terminale (B) et centrale (C) d'OprN, d'OprM et de TolC.	175
Figure 87 : Distribution électrostatique des charges à la surface d'OprN, d'OprM et de TolC.	176
Figure 88 : Vue de l'extrémité N-terminale d'OprN.	178
Figure 89 : Analyse chimique de l'extrémité N-terminale d'OprM. Les protéines ont été analysées en absence ou en présence de NBD-Cl (A) et en présence de MTS-EMCA (B).	181
Figure 90 : Empilement cristallin d'OprM dans le groupe d'espace C2.	182
Figure 91 : Identification des résidus contrôlant l'ouverture de la porine.	198
Figure 92 : Profil d'élution des mutants d'OprM en chromatographie d'exclusion stérique.	200
Figure 93 : Analyse des fractions d'OprM éluées après chromatographie d'exclusion stérique.	200
Figure 94 : Cristaux du mutant 4mut d'OprM obtenus au bout d'une semaine à 18°C (à 6 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après optimisation manuelle à partir de la condition 2. ...	202
Figure 95 : Cristal du mutant 2mut d'OprM obtenus au bout d'un peu plus d'un mois à 18°C (à 5 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après screening automatisé à l'aide du robot Mosquito.	203
Figure 96 : Cliché de diffraction d'un cristal du mutant 4mut d'OprM diffractant à 2,84 Å de résolution. Les tâches sont peu intenses mais bien séparées.	204
Figure 97 : Superposition des structures du canal en conformation fermée (OprM WT, en gris) et du mutant 4mut (OprM 4mut, en bleu) montrant les réarrangements structuraux autour des résidus mutés.	207
Figure 98 : Dilatation du pore au niveau de l'anneau Asp-Arg.	209

Figure 99 : Mouvement hélicoïdal de la leucine 412 conservée de la constriction périplasmique....	210
Figure 100 : Expression d'OprM à partir des vecteurs pME6001 et pUCP24.	213
Figure 101 : Résultats des mesures de CMI par la méthode de diffusion par gradient (E-test) pour la combinaison Ticarcilline-clavulanate (A), du méropénème (B), de l'amikacine (C, D) et de la tobramycine (E).	214
Figure 102 : Antibiotiques testés lors de la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de disques imprégnés.....	218
Figure 103 : Antibiogrammes des mutants d'OprM clonés à partir des vecteurs pME6001 et pUCP24.	218
Figure 104 : Mesure des CMI (mg/L) de mutants d'OprM par la méthode de dilution en milieu gélosé à partir des vecteurs pME6001 (A, Monlezun & al) et pUCP24 (B, cette étude).	222
Figure 105 : Analyse des complexes OprM-MexX par BN-PAGE.....	229
Figure 106 : Analyse du complexe OprM - MexE par BN-PAGE.	230
Figure 107 : Alignement multiple des séquences des domaines α (coiled-coil) des MFPs de <i>P. aeruginosa</i> (MexA, MexX et MexE) et d' <i>E. coli</i> (AcrA).....	232
Figure 108 : Identification des résidus de la surface d'interaction des MFPs potentiellement impliqués dans l'interaction avec l'OMF.....	233
Figure 109 : Identification des résidus de la surface d'interaction des OMF potentiellement impliqués dans l'interaction avec la MFP.	234
Figure 110 : Identification des complexes formés après co-précipitation par pull-down.	236
Figure 111 : Adaptation de la précipitation par pull-down aux conditions de transport.	238
Figure 112 : Profil d'élution de MexY en chromatographie d'exclusion stérique, à partir du vecteur pASK-IBA2.....	249
Figure 113 : Images de microscopie électronique de MexB (A et B) et de MexY (C).....	250
Figure 114 : Spectre de dichroïsme circulaire de MexY, cloné à partir du vecteur pASK-IBA2 réalisé à partir de deux concentrations (0,94 mg/mL en violet et 0,47 mg/mL en rouge).	252
Figure 115 : Représentation de la région codante du vecteur bicistronique pET-11a utilisé pour l'expression de MexY.....	254
Figure 116 : Profil d'élution de MexY en chromatographie d'exclusion stérique, à partir du vecteur pET-11a.....	255
Figure 117 : Pistes de cristallisation de MexY.	256
Figure 118 : Polymorphisme de la séquence protéique de la β -lactamase AmpC chez des isolats cliniques et environnementaux de <i>P. aeruginosa</i>	258
Figure 119 : Représentation de la structure de la β -lactamase AmpC de <i>P. aeruginosa</i> (en bleu) en complexe avec un inhibiteur (en vert)..	261

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des pompes d'efflux de la famille RND chez <i>P. aeruginosa</i>	47
Tableau 2 : Pourcentages d'identité de séquence entre les transporteurs RND des pompes MdtABC et MdtUVW d' <i>E. coli</i> et d' <i>Erwinia amylovora</i>	86
Tableau 3 : Récapitulatif des souches utilisées.	112
Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel	119
Tableau 5 : Programme de PCR utilisé pour les clonages	119
Tableau 6 : Récapitulatif des amorces utilisées.	126
Tableau 7 : Récapitulatif des plasmides utilisés.....	127
Tableau 8 : Composition des tampons utilisés au cours des différentes étapes de purification des OMF.	132
Tableau 9 : Composition des tampons utilisés au cours des différentes étapes de purification des MFP.....	133
Tableau 10 : Recommandations 2015 du CA-SFM pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	140
Tableau 11 : Liste des antibiotiques testés.....	143
Tableau 12 : Récapitulatif des conditions de cristallisation d'OprN optimisées manuellement.	155
Tableau 13 : Statistiques d'intégration et d'affinement des trois structures d'OprN.	155
Tableau 14 : Récapitulatif des conditions de cristallisation des mutants d'OprM optimisées manuellement.	201
Tableau 15 : Statistiques d'intégration et d'affinement de la structure du mutant ouvert, 4mut d'OprM.	205
Tableau 16 : Profil de résistance de la souche 4098 de <i>P. aeruginosa</i> , délétée de la β -lactamase AmpC et complétée avec des gènes mutés de <i>bla</i> _{AmpC}	259

PREFACE

PREFACE

La médecine moderne a connu un essor considérable avec la découverte et l'utilisation des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes.

Néanmoins, malgré de nombreuses avancées notables depuis la découverte de la pénicilline, le développement d'antibiotiques connaît un certain ralentissement. En effet, aucun nouveau type d'antibiotique n'a été découvert depuis bientôt 30 ans (**Fig. 1**) (Silver, 2011). Ceci est dû bien sûr au défi que représente la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques, que ce soit à partir de produits naturels ou des produits synthétiques disponibles dans les chimiothèques, mais également à des considérations économiques liées à la diminution de rentabilité d'anciens antibiotiques pour lesquels des brevets sont toujours en cours.

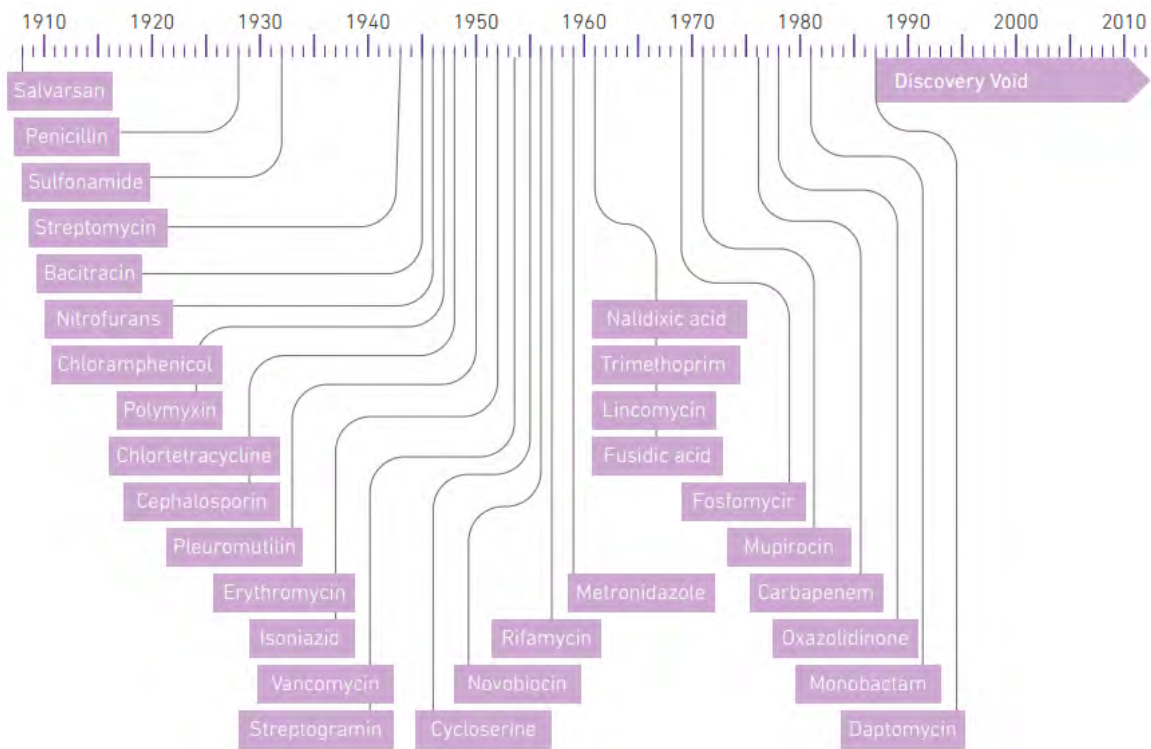


Figure 1 : Chronologie de la découverte des différentes classes d'antibiotiques. Les dates indiquées correspondent soit à la découverte initiale soit au dépôt de brevet. De nouveaux antibiotiques ont récemment été introduits : le linézolide en 2000, la daptomycine en 2003 et la rétapamuline en 2007, mais les trois familles d'antibiotiques auxquelles ils appartiennent, respectivement les oxazolidinones, les lipopeptides et les pleuromutilines avaient été décrites ou brevetées précédemment, respectivement en 1978, 1987 et 1952. (Adapté de Silver, 2011, Clinical Microbiology Review).

PREFACE

De plus, l'industrie pharmaceutique a privilégié le développement de nouveaux antibiotiques à partir de ceux préexistants, au détriment de la recherche de nouvelles sources, et quelle que soit leur origine (naturelle, hémi-synthétique ou synthétique), les antibiotiques actuels entraînent tous l'apparition de résistance (Wright, 2007). Leur usage abusif a d'ailleurs contribué à l'apparition de souches bactériennes multirésistantes (**Fig. 2**). Le nombre de décès liés à des infections causées par ces bactéries est estimé à 25 000 cas/an en Europe et à 23 000 cas/an aux États-Unis (données de l'OMS) et est en augmentation constante. La résistance aux antibiotiques constitue donc, à l'échelle mondiale, un problème de santé publique majeur.

Cette propension des bactéries à développer de la multirésistance résulte d'une part de la résistance croisée, au cours de laquelle un mécanisme biochimique confère la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, et d'autre part de la co-résistance, au cours de laquelle plusieurs mécanismes sont associés pour résister à un antibiotique donné au sein de la même bactérie.

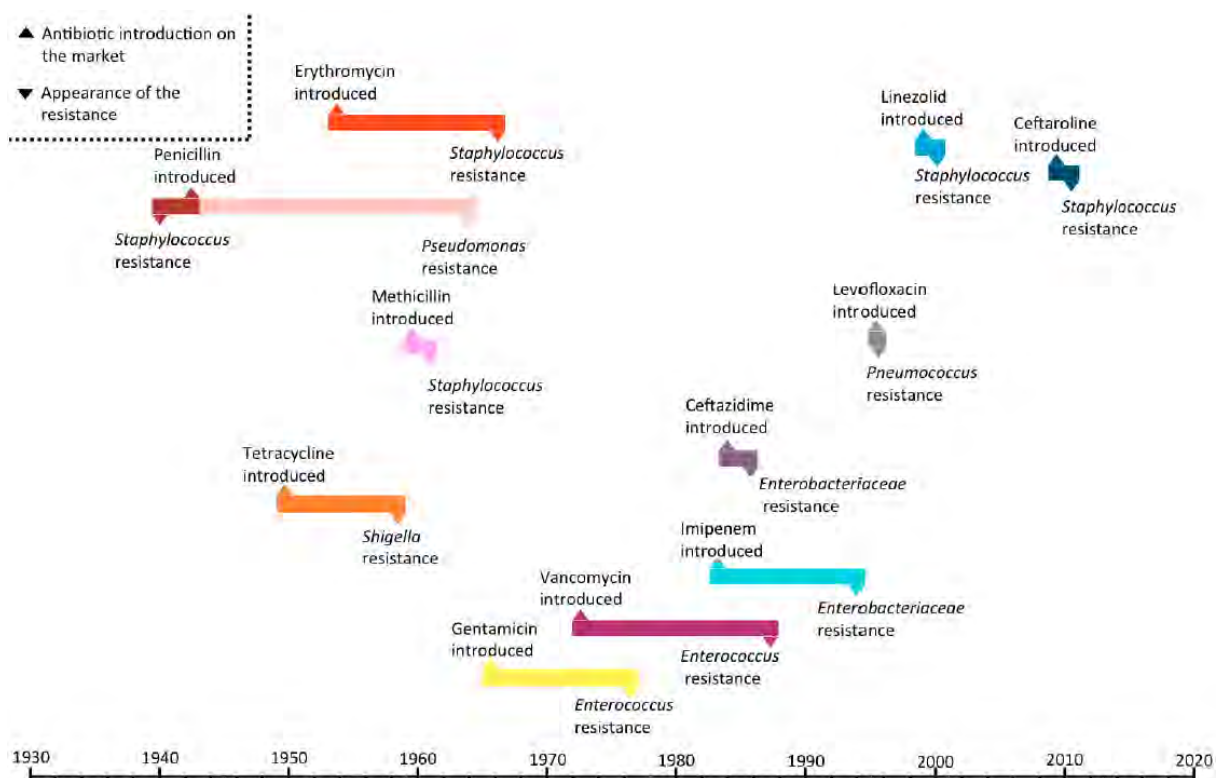


Figure 2 : Développement des antibiotiques et évolution de la résistance. (Adapté de Hede, 2014, Nature).

PREFACE

Ces bactéries multirésistantes incluent de nombreux pathogènes dont des bactéries Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou encore *Klebsiella pneumoniae*. Les pompes d'efflux tripartites de la famille RND, spécifiques des bactéries Gram négatif, constituent l'un des acteurs majeurs de ce phénomène et contribuent, avec d'autres familles de transporteurs, à la résistance intrinsèque et acquise de ces bactéries à de nombreuses molécules utilisées en antibiothérapie. De plus, la polyspécificité de ces pompes réduit de façon drastique l'arsenal thérapeutique et limite le développement de nouveaux antibiotiques, mais également d'inhibiteurs.

Ces pompes sont des complexes macromoléculaires qui permettent l'efflux des antibiotiques à travers les deux membranes (interne et externe) des bactéries Gram négatif. Les composants RND, OMF et MFP qui constituent ces complexes tripartites ont été caractérisés individuellement chez de nombreuses bactéries, aussi bien au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Cependant, les mécanismes qui régissent l'assemblage et la dissociation de la pompe, essentiels pour son fonctionnement, demeurent mal compris. La caractérisation structurale et fonctionnelle de ces composants, seuls ou assemblés au sein de la pompe, devrait permettre de mieux comprendre leurs rôles dans ce mécanisme. La caractérisation des pompes à efflux permettra donc de développer de nouvelles stratégies visant à inhiber leur activité, permettant ainsi de restaurer l'efficacité des antibiotiques préexistants et de développer de nouvelles molécules, telles que des bloqueurs d'assemblage.

Chapitre I

INTRODUCTION

1. Les antibiotiques : classification, mode d'action et cibles

Selon la définition de Selman Abraham Waksman (1943), les antibiotiques sont des substances chimiques organiques capables d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes ou de les détruire. En cas d'inhibition de la croissance, les antibiotiques sont dits « bactériostatiques » tandis qu'en cas de mort bactérienne, ils sont qualifiés de « bactéricides ». Un antibiotique bactériostatique à faible dose peut devenir bactéricide à dose plus élevée.

Les premiers antibiotiques identifiés (notamment la pénicilline, découverte en 1928 par Sir Alexander Fleming) étaient naturellement produits par des microorganismes (bactéries ou champignons) afin d'éliminer les microorganismes concurrents au sein de leur biotope. Mais le terme « antibiotique » a été attribué uniquement aux molécules dirigées contre les bactéries (on parle d'antifongique dans le cas des champignons).

Dans le cadre du traitement des infections bactériennes, ces antibiotiques naturels coexistent de nos jours avec des antibiotiques synthétiques et des antibiotiques hémisynthétiques, dérivés d'antibiotiques naturels chimiquement modifiés. C'est le cas des céphalosporines de seconde et de troisième génération, dérivées des céphalosporines naturelles dites de première génération. Seuls les antibiotiques d'origine naturelle ou dérivés d'une substance naturelle sont qualifiés « d'antibiotiques », les antibiotiques totalement synthétiques étant qualifiés « d'antibactériens » (Overbye & Barrett, 2005). Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de plusieurs critères :

- ✚ **leur origine** (comme décrit précédemment) : naturelle (produit par un microorganisme), synthétique (produit par synthèse chimique) ou hémisynthétique (produit à partir d'une substance naturelle modifiée),
- ✚ **l'agent infectieux ciblé** : le spectre d'activité de l'antibiotique sera étroit ou étendu suivant le nombre et le type d'agents infectieux (bactéries Gram positif et/ou Gram négatif) susceptibles d'être sensibles à l'action de cet antibiotique,
- ✚ **la nature chimique** : l'antibiotique sera classé au sein d'une famille dont le nom est défini à partir d'un groupement chimique commun à un ensemble d'antibiotiques ou à partir de la substance d'origine (cas des antibiotiques hémisynthétiques),

✚ **le mode d'action** : les cibles des antibiotiques sont variables et localisées aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de la bactérie.

1.1. Les familles d'antibiotiques

Suivant leur nature chimique, les antibiotiques sont regroupés au sein de six principales familles (**Fig. 3**) : les β -lactamines (**A**), les aminoglycosides (**B**), les cyclines (**C**), les phénicolés (**D**), les macrolides (**E**) et les oxazolidinones (**F**). Malgré leurs différences structurales, les lincosamides (**G**) et les streptogramines ou synergistines (**H**) sont associées aux macrolides, de par leur spectre d'activité et leur mode d'action proches. Deux autres familles d'antibiotiques, caractérisées par leur origine totalement synthétique, s'ajoutent à cette liste : les sulfamides (**I**) et les quinolones (**J**).

En plus des principales familles citées ci-dessus, on trouve également les polypeptides, les glycopeptides, les lipopeptides mais également des dérivés imidazolés tels que le métronidazole et des dérivés du nitrofurane tels que le nifuroxazide. Certains d'entre eux, notamment les polymyxines (polypeptide) et la vancomycine (glycopeptide) sont utilisés en dernier recours, en cas d'échec de l'antibiothérapie.

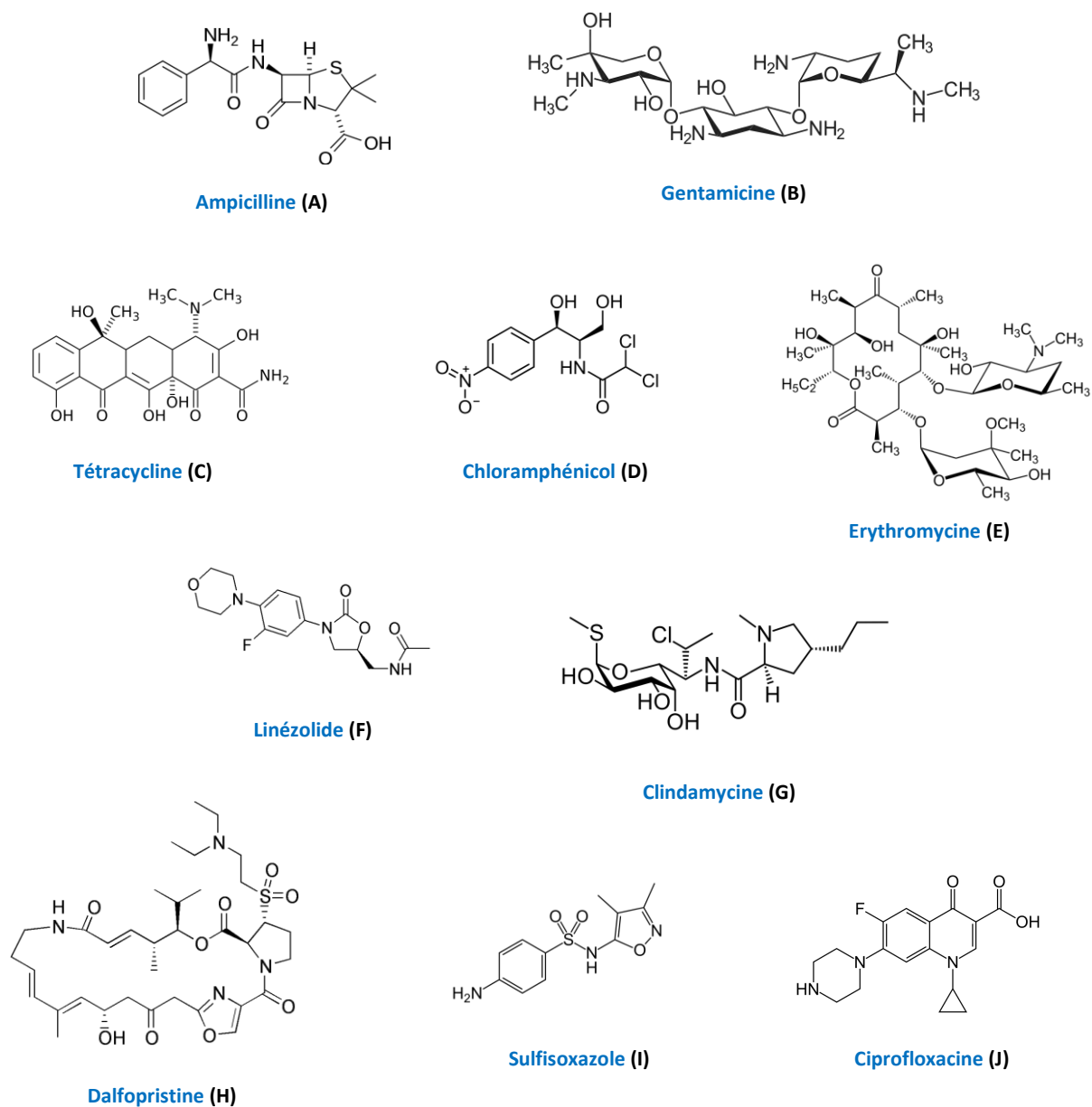


Figure 3 : Structures de quelques familles d'antibiotiques. (A) β -Lactamines. (B) Aminoglycosides. (C) Cyclines. (D) Phénicolés. (E) Macrolides. (F) Oxazolidinones. (G) Lincosamides. (H) Streptogramines. (I) Sulfamides. (J) Quinolones.

1.2. Mode d'action et cibles

La force de l'antibiothérapie réside dans la toxicité sélective des antibiotiques. Ils agissent spécifiquement sur des éléments intrinsèques au métabolisme bactérien, donc

absents chez les Eucaryotes et notamment chez l'Homme. Les mécanismes qui régissent leur action sur la prolifération ou la survie bactérienne sont variables et dépendent de leur cible, les principales étant la paroi, la synthèse protéique, la synthèse et la réparation des acides nucléiques ainsi que le métabolisme intermédiaire (synthèse de l'acide folique).

1.2.1. La paroi

1.2.1.1. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du peptidoglycane constitue la cible la plus largement exploitée dans le développement d'antibiotiques, ceci à cause de la différence de composition entre les membranes bactériennes et eucaryotes, mais également au sein des espèces bactériennes. En effet, les bactéries Gram positif possèdent une membrane unique recouverte d'un peptidoglycane épais (20 – 80 nm) contrairement aux bactéries Gram négatif qui en possèdent deux avec un peptidoglycane plus fin (7-8 nm) inséré au sein du périplasme, entre les deux membranes (**Fig. 4**).

Les étapes finales de la biosynthèse du peptidoglycane impliquent la synthèse cytoplasmique et la polymérisation (extracellulaire ou périplasmique selon les espèces) de chaînes composées de deux disaccharides, l'acide N-acétylmuramique (NAM) et le N-acétylglucosamine (NAG). La polymérisation est réalisée grâce à des transglycosylases, qui assurent l'élongation de la chaîne en catalysant la formation de liaisons glycosidiques entre les disaccharides préexistants et les disaccharides nouvellement formés. Les chaînes sont reliées par un pentapeptide, grâce à des transpeptidases, qui assurent la réticulation entre les chaînes en catalysant la formation de ponts peptidiques (pentaglycine) entre les pentapeptides.

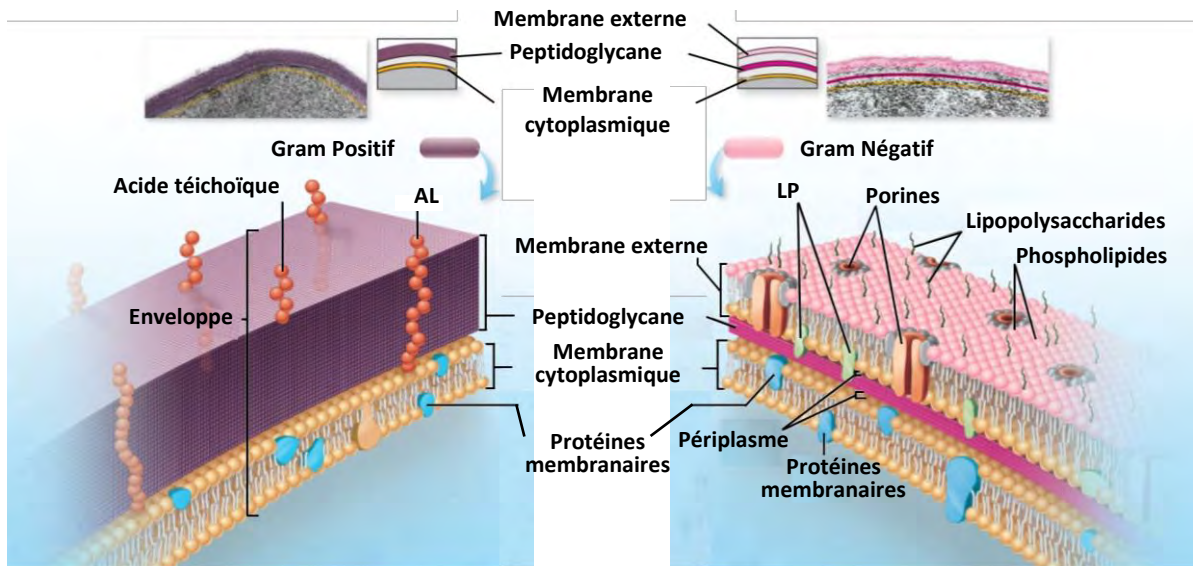


Figure 4 : Structure et composition des membranes des bactéries Gram positif et Gram Négatif. AL : Acide lipotéichoïque. LP : Lipoprotéines. (Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc).

Les antibiotiques ciblent principalement ces enzymes de synthèse (**Fig. 5**),

- ✚ soit en se substituant à leurs substrats, c'est le cas des β -lactamines qui forment des liaisons covalentes avec les transpeptidases (ou PLP, Protéines Liant la Pénicilline, plus connues sous leur nom anglais : PBP, penicillin-binding protein) ou encore de la moenomycine, seul antibiotique naturel (isolé de *Streptomyces*) se liant aux transglycosylases (Sauvage, 2016),
- ✚ soit en empêchant la liaison des enzymes à leurs substrats, c'est le cas de la vancomycine qui se lie au motif D-Ala-D-Ala des pentapeptides, motif reconnu par les transpeptidases (Courvalint & Arthura, 1993). D'autres antibiotiques tels que la bacitracine, mélange de polypeptides produits par *Bacillus subtilis*, interfèrent avec le transport des précurseurs du peptidoglycane à travers la membrane cytoplasmique (Storm, 1974).

Tous ces antibiotiques ont pour effet d'inhiber la synthèse du peptidoglycane, et par conséquent de fragiliser la paroi cellulaire.

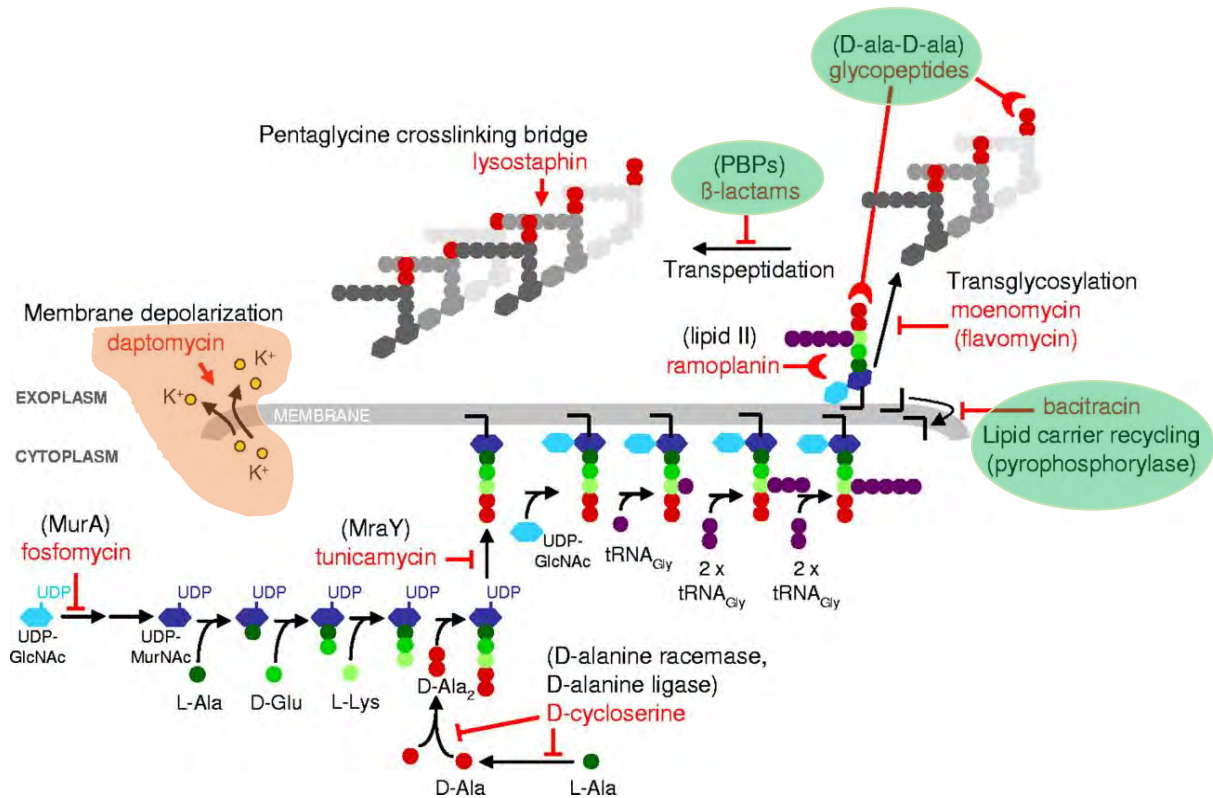


Figure 5 : Synthèse du peptidoglycane et cibles des antibiotiques. Quelques antibiotiques inhibiteurs de la dernière étape de biosynthèse du peptidoglycane (β -lactamines, glycopeptides, bacitracine, etc.) sont surlignés en vert et l'un des antibiotiques responsables de la déstabilisation des membranes est surligné en orange. Les cibles sont indiquées entre parenthèses. (Adapté de McCallum & al, 2011, Antimicrobial Agents Chemotherapy).

— T : Réactions enzymatiques inhibées.

— C : Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par liaison de l'antibiotique à un précurseur du peptidoglycane

— A : Clivage des ponts pentaglycine par la lysostaphine et dépolérisation de la membrane par la daptomycine.

1.2.1.2. Déstabilisation de la membrane

Certains antibiotiques chargés (cationiques ou anioniques) ou neutres sont capables de déstabiliser les membranes bactériennes.

Les polymyxines, principalement utilisées contre les bactéries Gram négatif, sont des polypeptides cationiques qui altèrent la perméabilité membranaire, en déplaçant les cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) liés aux lipides de surface chargés négativement, causant ainsi une expansion de la membrane externe et par conséquent la formation de pores, due à une perte de stabilité des lipides. Les polymyxines peuvent ainsi s'insérer dans la membrane externe et perméabiliser par la suite la membrane interne (Landman & al, 2008 ; Martti, 2010).

La daptomycine, qui est un lipopeptide, s'insère quant à elle au sein des membranes des bactéries Gram positif, en présence de calcium et provoque un efflux de potassium ainsi qu'une perte de gradient de concentration des ions, entraînant une dépolarisation de la membrane (**Fig. 5**) (Mech, 2014 ; Robbel & Marahiel, 2010).

Ces antibiotiques provoquent la mort des bactéries par lyse cellulaire. Ils sont cependant utilisés en dernier recours à cause de leur néphrotoxicité et de leur potentielle interaction (non spécifique) avec les membranes des cellules de l'hôte.

1.2.2. La synthèse protéique

La synthèse des protéines (résumée par la **Figure 6**) est dirigée, aussi bien chez les bactéries que chez les eucaryotes, par une machinerie cellulaire impliquant les ribosomes. À la différence du ribosome eucaryote 80S constitué de deux sous-unités 60S et 40S et de 78 protéines ribosomales, le ribosome bactérien 70S est constitué de deux sous-unités 50S et 30S et d'environ 54 protéines. Les antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique, peuvent donc cibler spécifiquement le ribosome bactérien. Malgré sa taille importante, seuls quelques sites sont ciblés par les antibiotiques (Wilson, 2014).

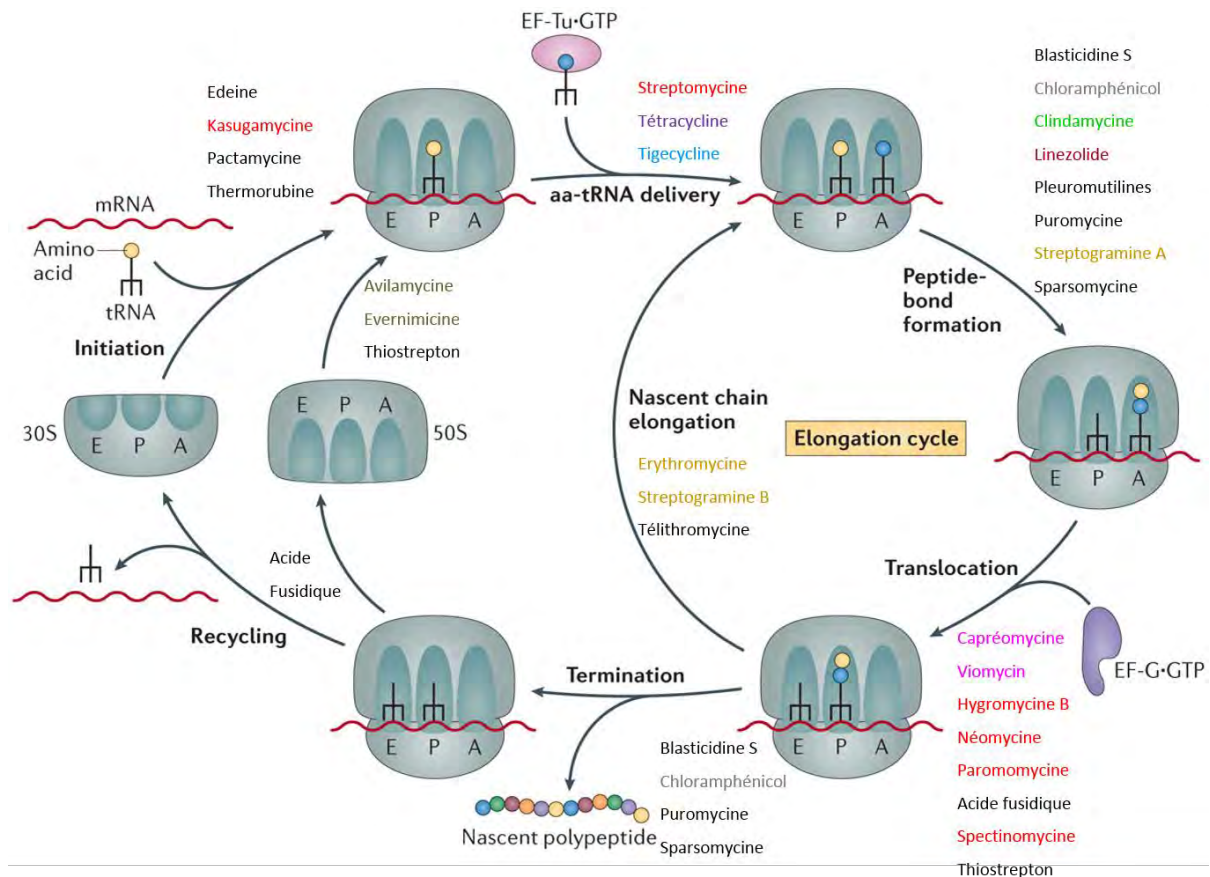


Figure 6 : Etapes de la biosynthèse des protéines et cibles des antibiotiques. Les antibiotiques agissent principalement au niveau des sous-unités 30S et 50S du ribosome à différentes étapes au cours de la traduction, en inhibant leur assemblage, leurs fonctions ou en favorisant la formation de complexes aberrants non fonctionnels. Ils inhibent également des facteurs d'élongation (EF-Tu et EF-G). Les **aminosides**, les **cyclines**, les **glycylcyclines**, les phénicolés, les **lincosamides**, les **oxazolidinones**, les **macrolides**, les **streptogramines**, les **tuberactinomycines** et les **orthosomycines** sont indiqués. Les glycylcyclines sont une famille d'antibiotiques héli-synthétiques dérivées des tétracyclines, les tuberactinomycines étant une famille de peptides antituberculeux naturels isolés de *Streptomyces*. Les orthosomycines correspondent à une famille de composés oligosaccharidiques naturels ayant des propriétés antibiotiques. (Adapté de Wilson, 2014, Nature Review Microbiology).

Les antibiotiques qui interagissent avec la sous-unité 30S ciblent principalement l'ARNm et les ARNt. Certains antibiotiques (édeine, kasugamycine) inhibent l'initiation de la traduction en empêchant une interaction stable entre l'ARNt initiateur et le codon initiateur au niveau du site P. Les aminoglycosides quant à eux, se lient de façon irréversible à la petite sous-unité 30S, provoquant des erreurs de lecture de l'ARNm. Ils empêchent également

l'élongation de la chaîne peptidique en inhibant le transfert du peptidyl-ARNt du site A vers le site P. D'autres antibiotiques tels que les tétracyclines ciblent également la sous-unité 30S en empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt au niveau du site A du ribosome, inhibant ainsi l'initiation de la traduction.

Trois principales familles d'antibiotiques ciblent la grande sous-unité 50S. Ils inhibent principalement l'initiation de la traduction et l'élongation de la chaîne peptidique. Le chloramphénicol (famille des phénicolés) se lie à une peptidyltransférase de la sous-unité 50S, inhibant ainsi la formation de la liaison peptidique. Les macrolides quant à eux, se lient à la sous-unité 50S, inhibant ainsi la réaction de transfert par la peptidyltransférase et la translocation du peptidyl-ARNt du site A vers le site P. Les lincosamides et les streptogramines présentent une activité similaire. Enfin, les oxazolidinones, notamment le linézolide, se lient à la sous-unité 50S et empêchent la fixation de l'ARNm et du f-Met-ARNt (ARN de transfert porteur du résidu initiateur de la synthèse peptidique), inhibant ainsi l'initiation de la traduction.

1.2.3. La synthèse et la réparation des acides nucléiques

Les antibiotiques peuvent interférer avec la synthèse des acides nucléiques à différents niveaux. Ils peuvent inhiber la synthèse des nucléotides ou leur interconversion.

Les antibiotiques ciblent également la réplication et la transcription de l'ADN (**Fig. 7**). Les rifampicines (ou rifampines), de la famille des rifamycines, inhibent l'initiation de la transcription en se liant de façon covalente à l'ARN polymérase au niveau du site de reconnaissance du promoteur. Les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine et la norfloxacine, inhibent quant à elles deux topoisomérases de type II, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Aldred & al, 2014). L'ADN gyrase catalyse la séparation des deux brins d'ADN, favorisant ainsi le déroulement local de la double hélice, nécessaire à la transcription et à la réplication. La topoisomérase IV est quant à elle responsable de la ségrégation des chromosomes qui intervient au cours de la division cellulaire. Les fluoroquinolones se lient aux complexes de clivage ADN-gyrase et ADN-topoisomérase IV au cours de l'hydrolyse de la

double hélice, formant un complexe stable et empêchant ainsi la progression de la polymérase (ADN polymérase ou ARN polymérase). L'accumulation de ces complexes non fonctionnels entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN, un arrêt de la prolifération cellulaire conduisant à la mort cellulaire et l'induction de la voie de réparation SOS.

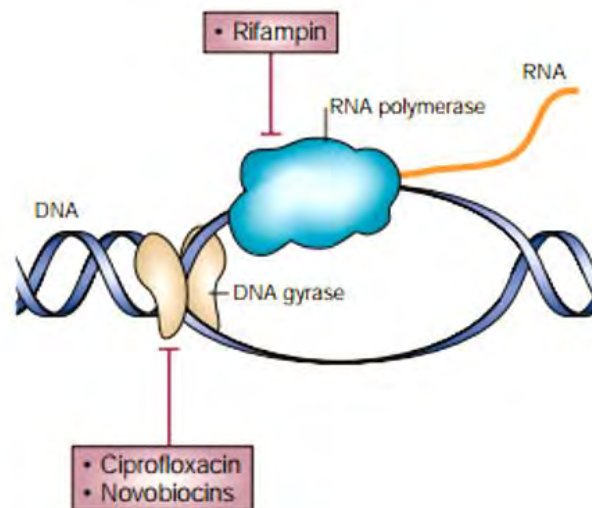


Figure 7 : Inhibition de la réplication des acides nucléiques. La rifampicine se lie à l'ARN polymérase et empêche sa liaison à l'ADN, inhibant ainsi l'initiation de la transcription. La ciprofloxacine et les novobiocines empêchent l'introduction de tours supplémentaires au sein de la double hélice d'ADN, bloquant ainsi la progression de l'ADN polymérase et inhibant par conséquent la réplication de l'ADN. (Adapté de Walsh, 2003, Nature Review Microbiology).

1.2.4. Le métabolisme intermédiaire

Des antibiotiques tels que le triméthoprime (de la famille des diaminopyrimidines) et les sulfamides interfèrent avec le métabolisme de l'acide folique, précurseur de la thymine, un composant essentiel de l'ADN (**Fig. 8**). Contrairement aux mammifères, les bactéries et les parasites ne possèdent pas de système de transport permettant l'acquisition d'acide folique préformé dans leur environnement et doivent donc le synthétiser. Les sulfamides inhibent de façon compétitive la biosynthèse du tétrahydrofolate, en se liant à la ptéridine

synthétase (ou dihydroptéroate synthase), enzyme responsable de la synthèse de son précurseur, l'acide dihydrofolique. Le triméthoprime va quant à lui inhiber la synthèse du tétrahydrofolate en se liant de façon compétitive à la dihydrofolate réductase.

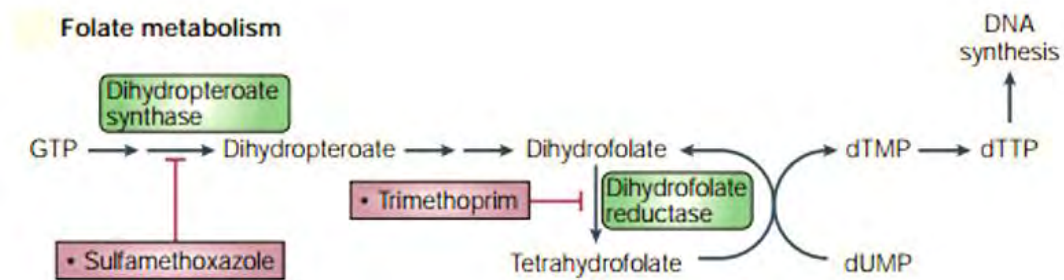


Figure 8 : Métabolisme de l'acide folique. L'acide folique est nécessaire à la synthèse de la thymine, un composant essentiel de l'ADN. Les différentes étapes au cours desquelles les antibiotiques interviennent sont indiquées par (\perp). (Adapté de Walsh, 2003, Nature Review Microbiology).

2. La résistance aux antibiotiques chez les bactéries.

Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes à certains antibiotiques mais elles sont également capables d'acquérir des gènes de résistance grâce à des mutations au sein de leur génome ou par transfert horizontal de gènes. Les différents types de résistance sont ainsi classés en trois catégories : naturelle, acquise ou adaptative (Fernández & Hancock, 2012) (Fig. 9).

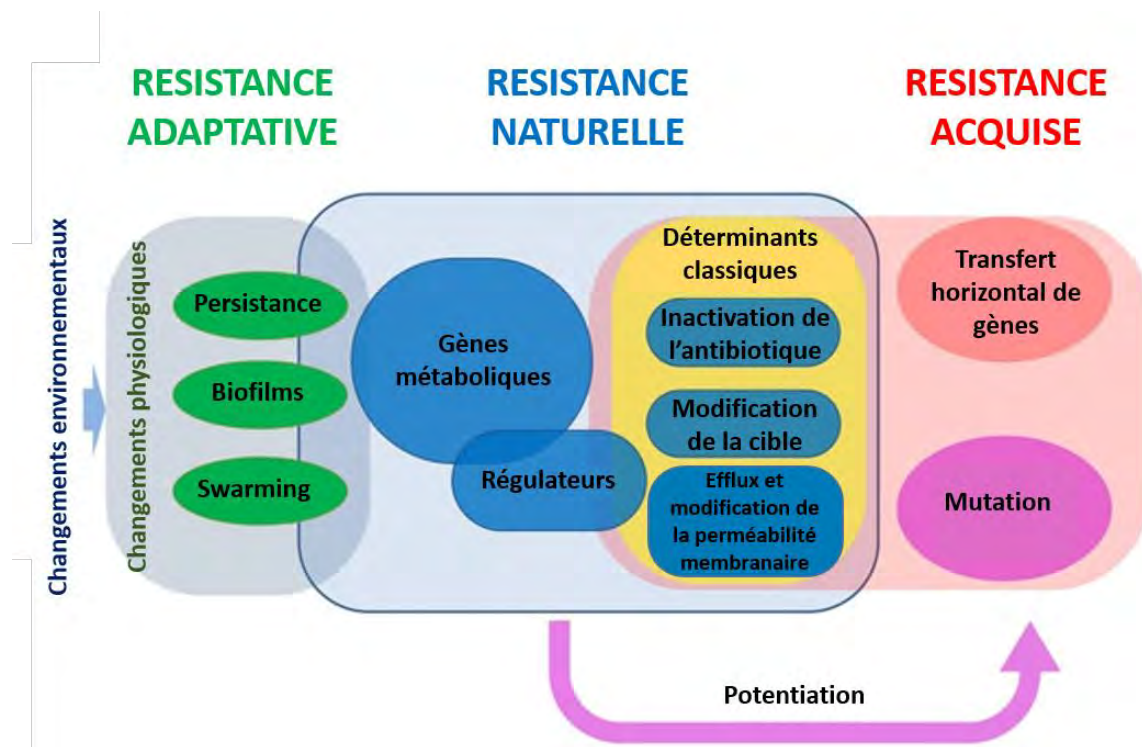


Figure 9 : Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries. (Adapté de Olivares & al, 2013, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy)

2.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle d'une bactérie est liée à sa capacité à résister à un antibiotique donné, grâce à des caractéristiques structurales ou fonctionnelles intrinsèques à cette bactérie. L'exemple le plus éloquent concerne la résistance liée à la différence de composition de la membrane (**Fig. 10**).

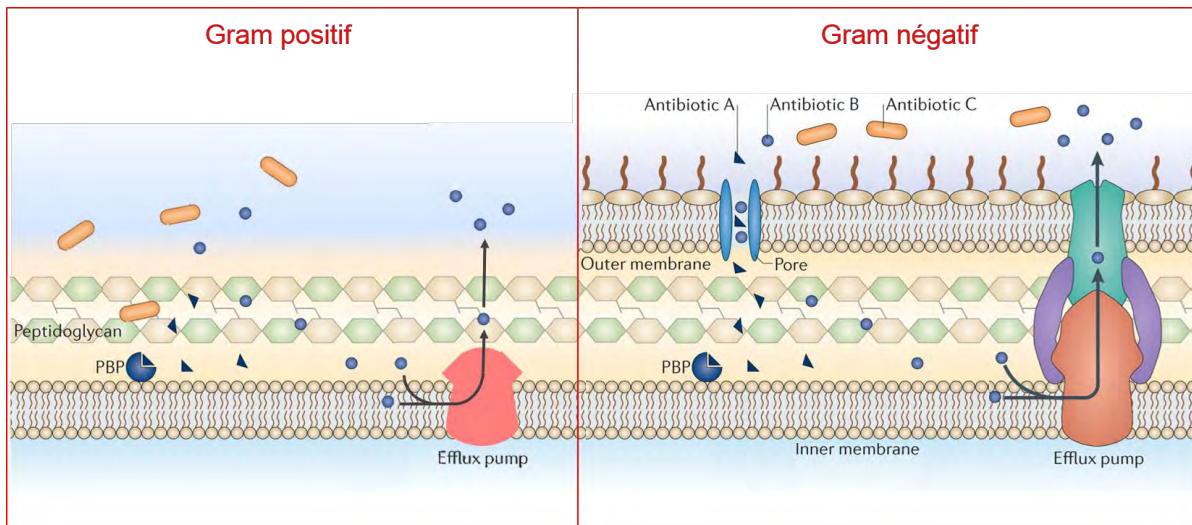


Figure 10 : Mécanismes de résistance naturelle. Les antibiotiques tels que les β -lactamines (antibiotique A) qui inhibent la synthèse du peptidoglycane peuvent être pris en charge par des enzymes de dégradation telles que les β -lactamases (PLP ou PBP). D'autres antibiotiques peuvent être exportés vers le milieu extracellulaire avant d'atteindre leurs cibles grâce à des pompes à efflux (antibiotique B). D'autres par contre ne pourront pas atteindre leur cible (antibiotique C) car ils sont incapables de traverser la membrane externe (cas des bactéries Gram négatif). (Adapté de Blair & al, 2015, Nature Review Microbiology).

Contrairement aux bactéries Gram positif, les bactéries Gram négatif possèdent deux membranes, une membrane externe et une membrane interne séparées par le périplasma (**Fig. 4**). La membrane externe a une structure asymétrique, constituée d'une couche interne contenant des phospholipides et d'une couche externe contenant les lipopolysaccharides (LPS). Cette organisation rend la membrane externe imperméable à de nombreuses

molécules, d'autant plus que la présence de porines sélectives limite l'entrée des molécules en fonction de leur taille, de leur état de charge et de leur hydrophilie (Cox & Wright, 2013).

Les antibiotiques de la famille des glycopeptides tels que la vancomycine (§ 1.2.1.1), qui inhibe la réticulation du peptidoglycane en se liant au motif D-Ala-D-Ala du pentapeptide, agissent uniquement contre les bactéries Gram positif car leur diffusion est impossible à travers la membrane externe des bactéries Gram négatif à cause de leur hydrophilie ni à travers les porines, à cause de leur poids moléculaire élevé (**Fig. 11**). Ils ne peuvent donc pas atteindre ces peptides dans le périplasma (Tsuchido & Takano, 1988).

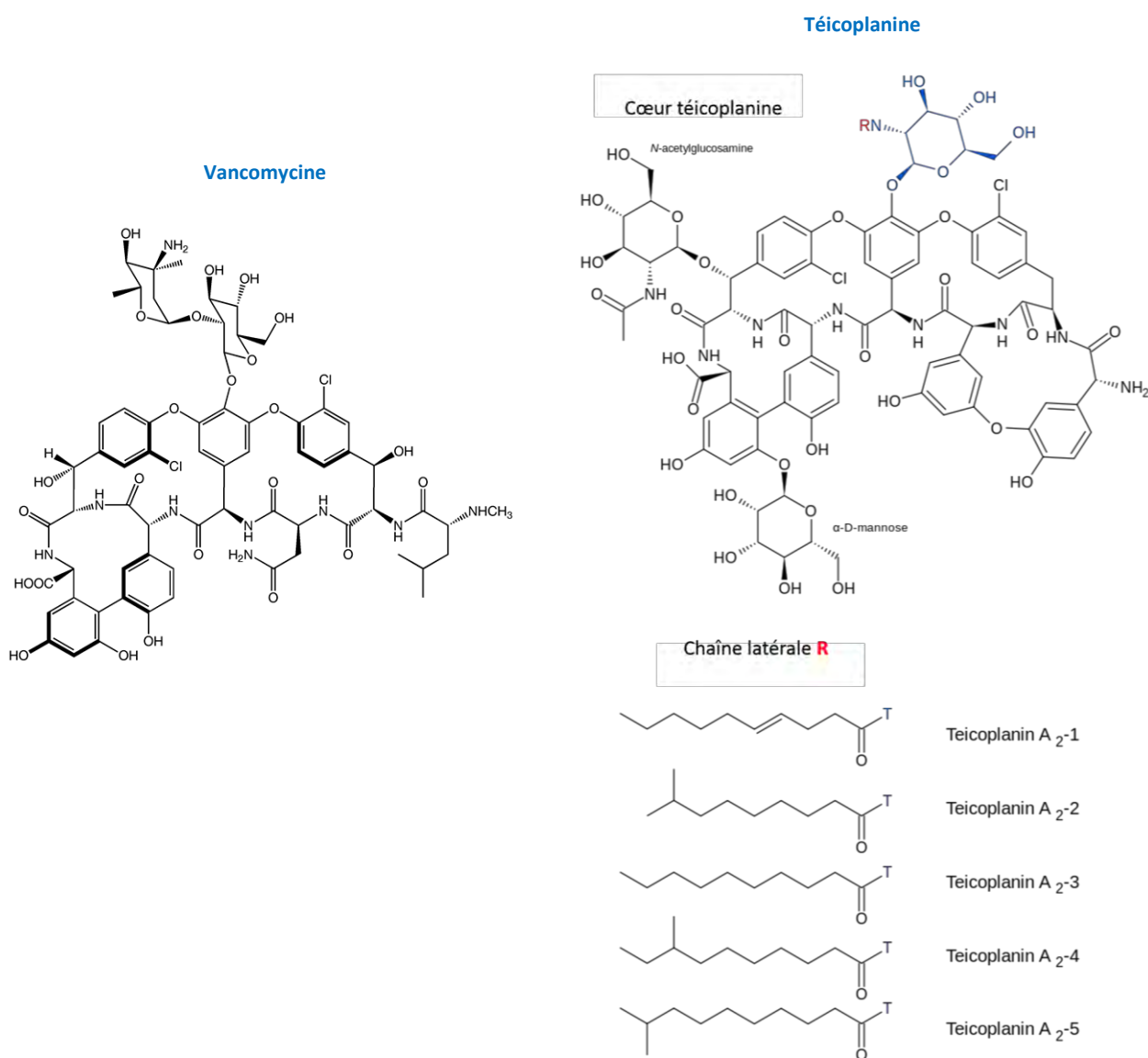


Figure 11 : Structure de quelques glycopeptides.

D'autres antibiotiques de la famille des lipopeptides tels que la daptomycine (§ 1.2.1.2), ciblent également les bactéries Gram positif car la membrane interne des bactéries Gram négatif possèdent une plus faible proportion en phospholipides anioniques, ce qui empêche l'insertion calcium-dépendante de la daptomycine, nécessaire pour l'activité antibactérienne de cet antibiotique à l'intérieur de la membrane (Randall & al, 2013).

La résistance naturelle est également liée à l'absence d'une cible, suite à la répression d'un gène au sein d'une espèce donnée. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont résistantes au triclosan (qui est un biocide), grâce à la présence d'un allèle réprimé du gène *fabI*, codant pour une énoyl-ACP réductase, enzyme ciblée par le triclosan chez les espèces sensibles. D'autre part, la résistance naturelle peut être liée à la présence au sein du génome de gènes codant pour des enzymes de modification des cibles ou des antibiotiques (ex : les β -lactamases) ou encore à la présence de systèmes d'efflux (Blair & al, 2015). Ces mécanismes de résistance seront décrits au paragraphe suivant (§ 2.2.1.2).

En plus des mécanismes précédemment cités, la réparation des dommages à l'ADN intervient également dans la résistance naturelle. En effet, des antibiotiques tels que les fluoroquinolones (§ 1.2.3) d'une part, et les dérivés imidazolés tels que la nitrofurantoïne et le métronidazole d'autre part, qui provoquent des dommages à l'ADN, entraînent respectivement l'activation des voies de réparation SOS et RecF, qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN simple brin (ssADN) (Olivares & al, 2013). Le système de réparation RecBCD, impliqué dans la réparation de l'ADN double brin (dsADN), est également impliqué dans la résistance.

2.2. La résistance acquise

Les différents mécanismes qui permettent aux bactéries d'acquérir ou de développer des résistances sont classés en trois principaux groupes :

- ✚ la réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique
- ✚ la modification de la cible
- ✚ la modification ou la dégradation de l'antibiotique

2.2.1. La réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

La réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique est une conséquence de la réduction de la perméabilité membranaire et de l'augmentation du phénomène d'efflux.

2.2.1.1. Réduction de la perméabilité membranaire

Les bactéries Gram négatif sont naturellement peu perméables à plusieurs antibiotiques grâce à leur membrane externe qui joue le rôle de filtre (Nikaido, 1994). Des systèmes de transport, essentiellement des porines, sont donc nécessaires pour le passage des molécules, et notamment des molécules hydrophiles.

Certaines de ces porines, à l'instar des porines OmpF et OmpC d'*Escherichia coli*, s'assemblent en trimères au sein de la membrane externe des bactéries Gram négatif, d'autres, telles que OmpG étant monomérique (**Fig. 12**). Les monomères forment des tonneaux β transmembranaires. Les brins β sont reliés par des boucles extracellulaires exposées à la surface, plus ou moins longues selon les porines, et des boucles périplasmiques plus petites. Des boucles spécifiques sont localisées à l'intérieur de la porine (au centre du tonneau) formant avec les résidus hydrophiles de certains brins β , la zone de constriction de la porine. Même si cette zone de constriction (50 à 100 Å de diamètre suivant l'état d'hydratation) permet de limiter l'entrée dans la cellule à des molécules d'une certaine taille, les porines sont pour la plupart non spécifiques, le transport s'effectuant par diffusion (Kojima & Nikaido, 2013).

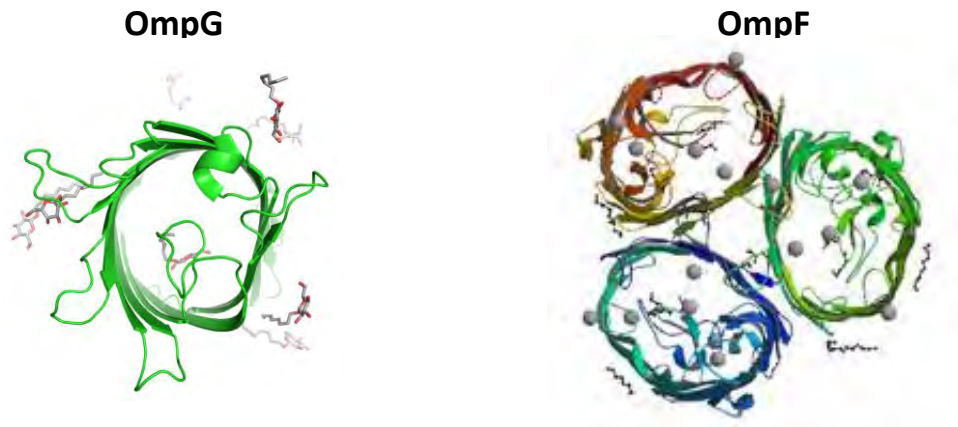


Figure 12 : Structures d'une porine monomérique (OmpG) et d'une porine trimérique (OmpF) d'*E. coli*. Code PDB : 2IWW et 4LSF.

La structure de la porine OmpF d'*Escherichia coli* (**Fig. 13**), résolue en complexe avec trois β -lactamines présentant des états de charge différents (l'ampicilline qui est un zwitterion, la carbénicilline et l'ertapénème qui sont respectivement des antibiotiques di-anionique et anionique), a notamment permis de mieux comprendre le mécanisme d'import. Les simulations de translocation réalisées par dynamique moléculaire ont permis de montrer que la nature de ces antibiotiques affecte la fixation et la vitesse de translocation, mais qu'elle n'affecte pas la diffusion à travers la porine (Ziervogel & Roux, 2013).

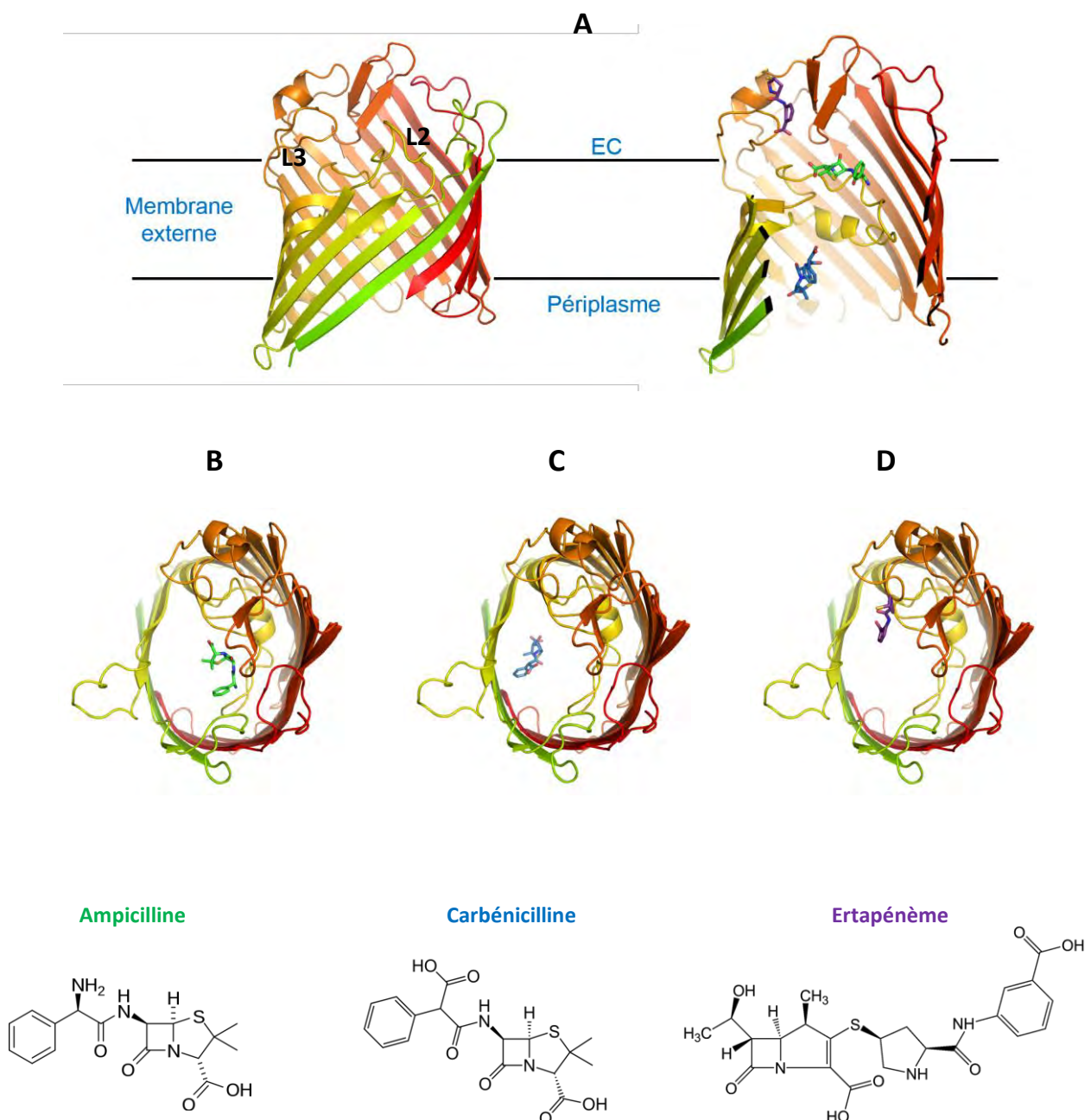


Figure 13 : Structure d'un monomère de la porine OmpF d'*Escherichia coli* en complexe avec différentes β -lactamines (A). Les sites de fixation des antibiotiques sont représentés par superposition à la structure du monomère d'OmpF, des positions de l'ampicilline (en vert), de la carbénicilline (en bleu) et de l'ertapénème (en violet) au sein de la structure d'OmpF. **Vue de l'extrémité extracellulaire du monomère.** (B) en complexe avec l'ampicilline (code PDB 4GCP). (C) en complexe avec la carbénicilline (code PDB 4GCQ). (D) en complexe avec l'ertapénème (code PDB 4GCS). Les trois antibiotiques présentent des sites de fixation et des conformations différents malgré leur appartenance à la même famille, montrant ainsi que les porines permettent l'entrée par diffusion dans la cellule de molécules variées. Les boucles L2 et L3 sont indiquées. EC : extrémité extracellulaire.

La pression de sélection exercée par les antibiotiques favorise l'apparition de mutations au sein des gènes codant pour des porines mais également au sein des gènes régulateurs de leur expression, entraînant ainsi une répression de l'expression de ces porines ainsi que leur substitution par des canaux sélectifs, capables de limiter l'entrée des antibiotiques à l'intérieur des cellules (Tamber & Hancock, 2003 ; Blair & al, 2015). Le diamètre de la zone de constriction de la porine spécifique des maltodextrines LamB d'*Escherichia coli*, est réduit à 50 Å par la présence de 2 boucles supplémentaires à l'intérieur du tonneau, limitant ainsi l'accès de molécules de plus grande taille. Les facteurs qui régissent la sélectivité des porines impliquent donc la répulsion de charges, la taille et l'hydrophobicité (Cox & Wright, 2013).

Ce mécanisme est de plus en plus impliqué dans la résistance à de nouveaux antibiotiques tels que les carbapénèmes et les céphalosporines, qui sont généralement pris en charge par des enzymes de dégradation (Blair & al, 2015).

2.2.1.2. Augmentation de l'efflux

Les pompes à efflux sont des systèmes de transporteurs membranaires impliqués dans l'efflux actif des antibiotiques vers le milieu extracellulaire. Elles sont naturellement produites par les bactéries et sont impliquées dans la résistance naturelle.

L'expression de la plupart de ces pompes est régulée par des répresseurs spécifiques (MarR pour la pompe AcrAB-TolC chez *Escherichia coli*, MexZ et MexR pour les pompes MexXY-OprM et MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa*, MtrR pour la pompe MtrCDE chez *Neisseria gonorrhoeae*) (Grkovic & al, 2006). L'introduction de mutations au sein de ces gènes régulateurs entraîne une levée de l'inhibition, conduisant ainsi à la surproduction des pompes à efflux (Nikaido, 2009) (**Fig. 14**).

Chez *Escherichia coli*, l'expression de la pompe AcrAB-TolC est régulée par un répresseur de la famille TetR. L'inhibition du répresseur peut être levée par des facteurs de transcription de la famille AraC, dont l'expression est régulée par des répresseurs de la famille MarR. Cette famille de répresseurs contrôle la production de facteurs de virulence, la

réponse aux antibiotiques et au stress oxydatif et le catabolisme des composés aromatiques environnementaux. Des mutations au sein des gènes codant pour des répresseurs de type TetR ou MarR entraînent une levée de l'inhibition et par conséquent une surexpression de la pompe AcrAB-TolC.

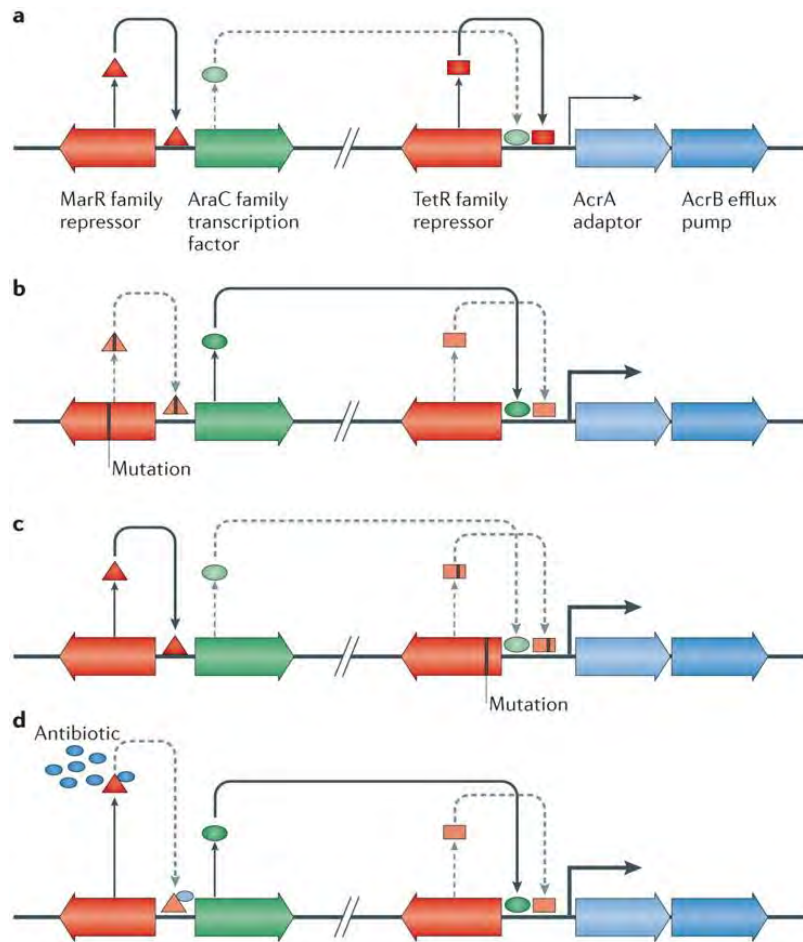


Figure 14 : Régulation de l'expression des pompes à efflux. L'expression des gènes codant pour des pompes à efflux est contrôlée par des gènes régulateurs locaux situés à proximité de ces gènes (de type TetR) et des régulateurs dits globaux. Ces régulateurs globaux incluent les facteurs de transcription (de type AraC) dont l'expression est régulée par un répresseur (MarR chez *Escherichia coli*) (a). Des mutations au sein de gènes codant pour des répresseurs, des facteurs de transcription ou des séquences intergéniques peuvent entraîner une surexpression des pompes à efflux (b, c), elle peut également être un résultat de l'induction en réponse à des signaux environnementaux tels que la fixation d'une molécule à un répresseur, réduisant ainsi son affinité pour son gène cible (d). Les voies activées sont indiquées par les flèches pleines et les voies inhibées par des flèches en pointillés. (Adapté de Blair & al, 2015, Nature Review Microbiology).

Certaines pompes à efflux sont spécifiques d'une famille d'antibiotiques donnée mais la plupart d'entre elles sont beaucoup moins spécifiques et transportent une large gamme de molécules. C'est le cas du transporteur AcrB d'*Escherichia coli* qui transporte aussi bien des colorants, des détergents que des solvants (Nikaido, 2009). La surexpression de ces pompes, observée notamment chez des isolats cliniques multirésistants (Poole, 2005) entraîne donc une augmentation de la résistance aux antibiotiques habituellement utilisés en antibiothérapie. Cette résistance est d'autant plus importante que certains des gènes codant pour ces pompes sont portés par des éléments mobiles, notamment des plasmides qui peuvent être transférés d'une bactérie à l'autre, contribuant ainsi à une propagation rapide de la résistance.

Le plasmide portant les gènes codant pour la pompe à efflux OqxAB, impliquée dans la résistance aux quinolones, est de plus en plus présent chez la plupart des Entérobactéries. Ces gènes, normalement portés par le chromosome bactérien, ne confèrent pas de résistance aux quinolones, sauf chez les bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae* auxquelles ils confèrent une résistance à l'olaquinox (additif alimentaire aux propriétés antibactériennes utilisé dans les élevages), au chloramphénicol et aux quinolones. La transposition de l'opéron chromosomal au plasmide contribue à augmenter la capacité de résistance de façon significative (d'un facteur 80). L'augmentation de la résistance des Entérobactéries aux fluoroquinolones médiée par la pompe à efflux OqxAB semble donc liée à la dissémination de ce plasmide (Wong & al, 2015).

Il existe plusieurs systèmes membranaires impliqués dans l'efflux et répartis en cinq familles (**Fig. 15**) en fonction de la source d'énergie, de la nature des substrats et du type d'ancrage à la membrane:

- ✚ **la famille ABC** (ATP-Binding Cassette) qui utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour le transport des molécules,
- ✚ **les familles MFS** (Major Facilitator Superfamily), **SMR** (Small Multidrug Resistance), **MATE** (Multidrug And Toxic compound Extrusion) et **RND** (Resistance-Nodulation-Division) qui couplent l'efflux des molécules à un gradient membranaire d'ions sodium ou de protons, utilisé comme source d'énergie.

Les transporteurs de la famille RND (qui seront décrits de façon plus exhaustive au paragraphe 4) sont des complexes tripartites insérés dans les deux membranes (externe et interne) et sont par conséquent spécifiques des bactéries Gram négatif. Les autres familles de transporteurs sont insérées uniquement dans la membrane interne (ou cytoplasmique chez les bactéries Gram positif) et sont donc présentes chez tous les types bactériens. Une sixième famille, la famille PACE (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux), homologue de la famille de transporteurs RND, a récemment été décrite pour son implication dans l'efflux actif (Hassan & al, 2015 ; Hassan, Elbourne, & al, 2015).

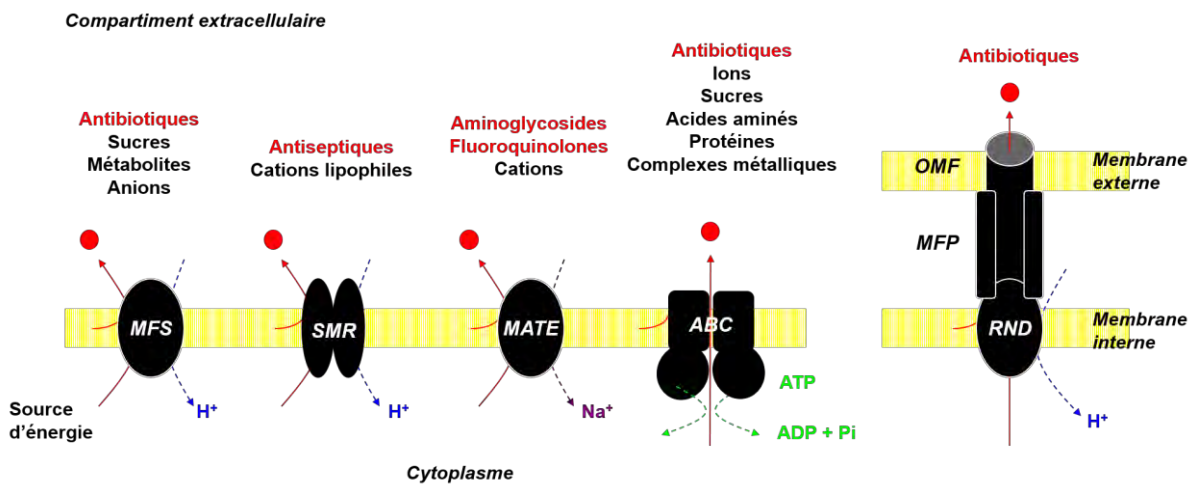


Figure 15 : Les différents systèmes d'efflux bactériens.

2.2.2. La modification de la cible

Un autre système de résistance passe par la modification de la cible. En effet, pour être efficace, un antibiotique doit pouvoir interagir avec sa cible. Les bactéries sont cependant capables de développer des résistances en incorporant des mutations au sein de gènes codant pour des protéines cibles, empêchent ainsi l'interaction avec l'antibiotique tout en conservant une protéine fonctionnelle.

C'est le cas de la résistance aux fluoroquinolones (§ 1.2.3), qui est liée à la mutation des enzymes cibles, les topoisomérases. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, la résistance liée à la mutation de la gyrase GyrA est due à la substitution de certains résidus tels que la glycine 83 remplacée par une alanine ou encore de l'aspartate 94 remplacé par une asparagine, une alanine ou une glycine (Aubry & al, 2006 ; Matrat & al, 2008). Ces modifications semblent minimes mais elles sont suffisantes pour modifier la conformation de l'enzyme, empêchant ainsi la fixation de l'antibiotique tout en conservant une protéine fonctionnelle (Piton & al, 2010) (Fig. 16).

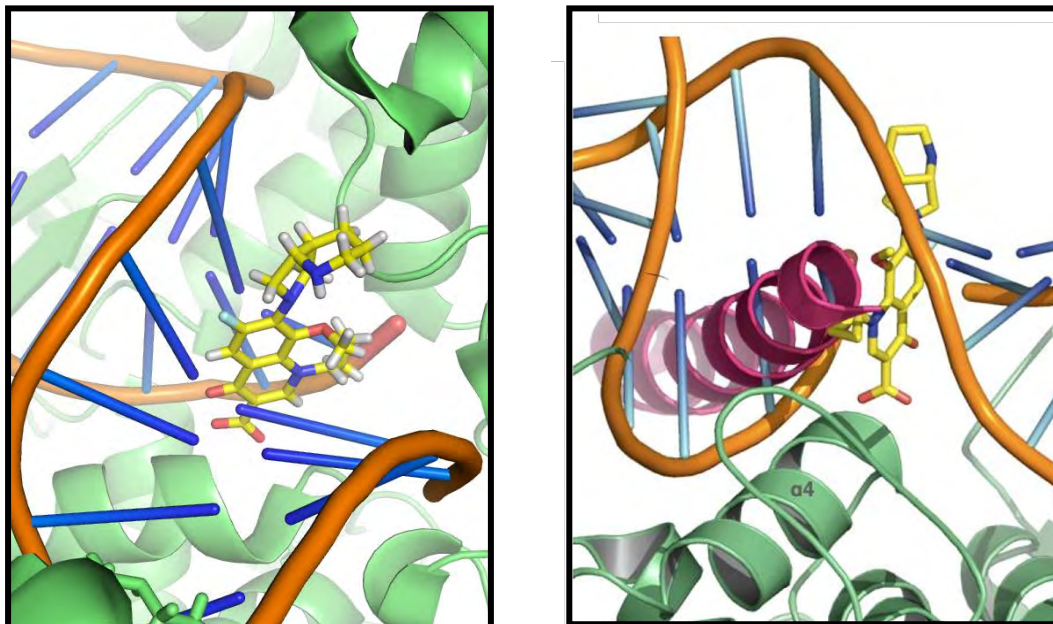


Figure 16 : Représentation du site actif de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* en complexe avec une quinolone. Contrairement à la forme sauvage de l'enzyme (en vert, à gauche, code PDB 5BS8), la forme mutée (en vert à droite, code PDB 3IFZ), retrouvée chez les souches résistantes aux quinolones présente une extrémité N-terminale structurée en hélice (en rose). Le modèle décrit sur la base de la structure de l'enzyme mutée montre que cette hélice occupe la poche de fixation des quinolones (en jaune) au sein du dimère, provoquant ainsi un encombrement stérique avec l'ADN substrat (en orange) et l'antibiotique (en jaune). (Adapté de Piton & al, 2010, PLoS One).

La résistance par modification de la cible passe également par la surexpression de certains gènes régulateurs qui contribuent à protéger les cibles de l'action des antibiotiques. Chez *E. coli*, la protéine de signalisation PmrD est surexprimée en réponse à des signaux environnementaux, inhibant ainsi la déphosphorylation de la protéine régulatrice PmrA par la protéine senseur PmrB. Les gènes régulés par PmrA et PmrB, codant pour des enzymes de modification du lipide A (LPS), notamment ArnT et EptA, sont par conséquent exprimés de façon continue et constitutive, conduisant à une modification du LPS par addition de groupements tels que le 4-amino-4-desoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ou le phosphoethanolamine (pEtN) (Fig. 17). Ces groupements réduisent la charge négative nette du LPS, minimisant la fixation des antibiotiques cationiques, rendant ainsi la bactérie résistante, notamment aux polymyxines (§ 1.2.1.2) (Rubin & al, 2015).

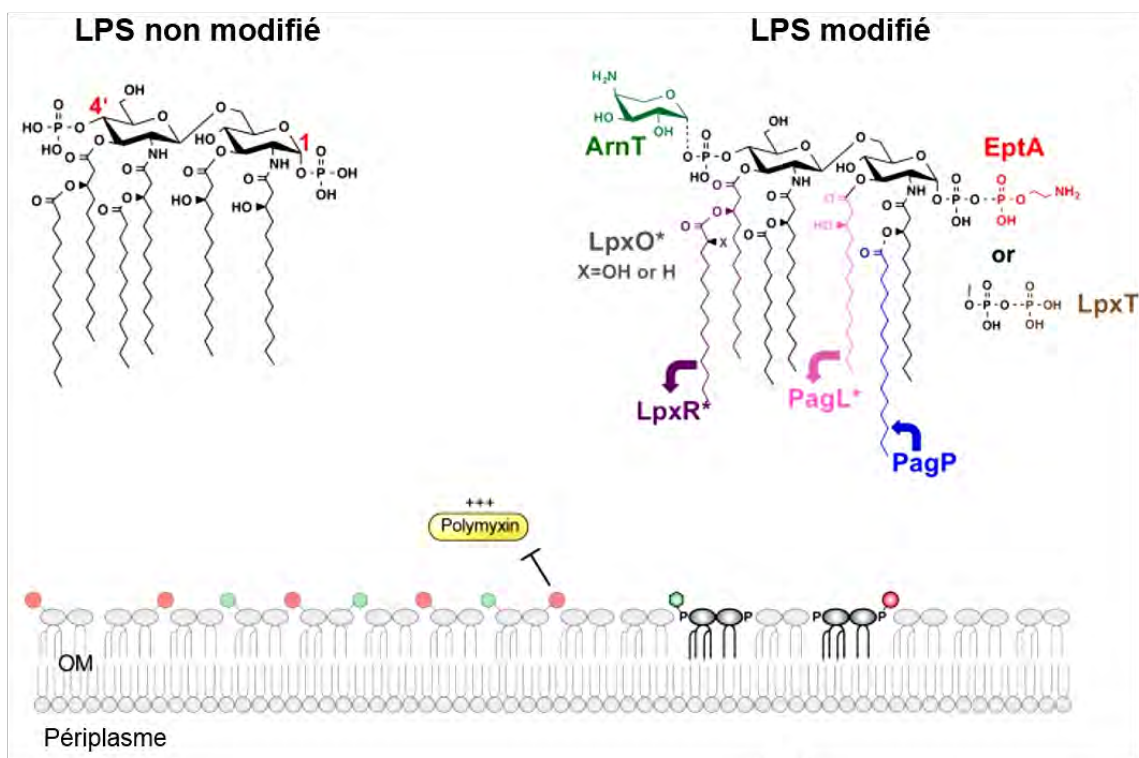


Figure 17 : Modification du LPS et résistance aux polymyxines. Les enzymes ArnT et EptA modifient le LPS en additionnant des groupements tels que le 4-amino-4-desoxy-L-arabinose (L-Ara4N) ou le phosphoethanolamine (pEtN), empêchant ainsi l'interaction avec les polymyxines. (Adapté de Rubin & al, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

Les bactéries peuvent également acquérir des gènes homologues à la cible de l'antibiotique. C'est le cas des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à une β -lactamine, la méthicilline (SARM). Cette résistance est due à l'acquisition d'une cassette chromosomique *SCCmec* portant le gène *mecA*. Ce gène code pour une protéine additionnelle (PLP2a), ayant une faible affinité pour les β -lactamines et étant donc capable de se substituer aux PLPs natives, inhibées en présence d'antibiotiques (Katayama, Ito, & Hiramatsu, 2000). Elle permet ainsi une résistance croisée aux antibiotiques de la famille des β -lactamines.

2.2.3. La modification ou la dégradation de l'antibiotique

L'inactivation des antibiotiques par des enzymes constitue le mécanisme de résistance naturel le plus répandu. Cette inactivation peut s'effectuer par hydrolyse ou par addition d'un groupement chimique (phosphorylation, acétylation, adénylation), empêchant ainsi l'interaction de l'antibiotique avec sa cible. Ces enzymes d'inactivation sont naturellement produites par les bactéries. Néanmoins, des copies supplémentaires des gènes les codant peuvent être apportées par des plasmides, conférant ainsi une résistance accrue ou un élargissement du spectre d'activité des bactéries qui les portent.

2.2.3.1. Inactivation par hydrolyse enzymatique

Les β -lactamases sont les hydrolases les plus répandues et les plus importantes dans la résistance aux antibiotiques des souches cliniques. Elles hydrolysent le noyau β -lactame des β -lactamines et sont classées en différentes sous-familles en fonction de la classe de β -lactamines hydrolysées (pénicillinasés, céphalosporinasés, carbapénémases, etc.) et du mécanisme d'hydrolyse (Sérine β -lactamases et métallo- β -lactamases) résumé par la **Figure 18**.

Les β -Lactamases sont naturellement produites par les bactéries, mais le développement de nouveaux antibiotiques ayant une meilleure affinité pour leurs substrats a cependant entraîné l'émergence de nouvelles β -lactamases possédant un spectre d'activité beaucoup plus large, les BLSE (β -Lactamases à Spectre Étendu) (Jacoby & Medeiros, 1991). Les BLSE (pour la plupart dérivées des β -Lactamases des familles SHV ou TEM) sont capables d'hydrolyser les β -lactamines de seconde, de troisième et parfois de quatrième génération (carbapénèmes, céphalosporines) et leur présence chez les bactéries Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et les bactéries du genre *Acinetobacter* contribuent à l'apparition de nouvelles souches résistantes à la majorité, voire à toutes les β -lactamines (Bush & Fisher, 2011). La plupart des plasmides portant les gènes codant pour des BLSE portent également des gènes de résistance aux aminoglycosides et au triméthopime (Jin & al, 2014 ; Xia & al, 2016), ce qui contribue à une résistance croisée avec d'autres familles d'antibiotiques.

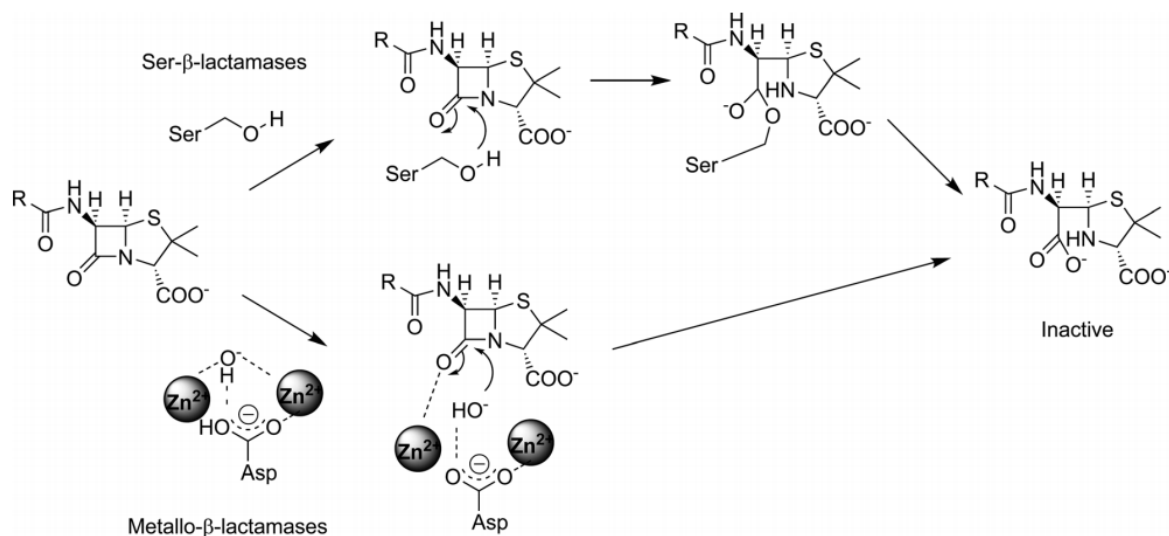


Figure 18 : Mécanisme d'action général des Sérine et des métallo- β -lactamases. (Wright, 2011, Chemical Communications).

L'augmentation de la résistance aux β -lactamines résulte d'une part du transfert des gènes codant pour des β -lactamases, initialement porté par le chromosome bactérien, aux plasmides, augmentant ainsi le nombre de copies des gènes et contribuant de ce fait à la surexpression de ces enzymes. Elle résulte d'autre part de mutations au sein de gènes codant pour ces enzymes (TEM, SHV) et du transfert de plasmides (et donc de gènes de résistance) d'une bactérie à une autre. Chez *E. coli*, le niveau d'expression basal de la β -lactamase AmpC est faible et ce gène est inexistant au niveau du chromosome des bactéries du genre *Klebsiella* et *Salmonella*. Mais la présence de plasmides porteurs de gènes codant pour cette β -lactamase entraîne une augmentation de la résistance similaire à celle observée chez des souches mutantes d'*Enterobacter cloacae* résistantes aux céphalosporines (Xia & al, 2016).

En plus des BLSE dérivées des familles SHV ou TEM, il existe d'autres familles d'enzymes impliquées dans la résistance aux β -lactamines. Elles agissent principalement contre les oxyimino- β -lactamines (Bush & Fisher, 2011) et les plus répandues sont :

- ✚ **les β -lactamases AmpC à spectre étendu (ESAC)**, qui hydrolysent la plupart des céphalosporines. Cependant elles hydrolysent peu les nouveaux carbapénèmes (ertapénème et doripénème) et les céphalosporines zwitterioniques (céfépime) pour lesquels leur affinité est faible,
- ✚ **les BLSE de la famille CTX-M** (CTX-M14 et CTX-M15) qui dérivent de bactéries environnementales non pathogènes du genre *Kluyvera* et qui hydrolysent majoritairement la céfotaxime par rapport aux autres oxyimino β -lactamines,
- ✚ **les sérines β -lactamases (KPC) et les métallo- β -lactamases (VIM, IMP et les enzymes de la famille NDM)** qui hydrolysent principalement les carbapénèmes.

2.2.3.2. Inactivation par addition d'un groupement chimique

L'addition de groupements chimiques aux antibiotiques par les enzymes bactériennes entraîne un encombrement stérique qui empêche la fixation de l'antibiotique à sa cible. Différents groupements chimiques peuvent être ajoutés aux antibiotiques (acyle, phosphate,

nucléotidyl). Les aminoglycosides constituent des cibles de choix pour les enzymes de modification à cause de l'accessibilité des groupements hydrophiles (hydroxyle, amide) de ces antibiotiques polycationiques.

Les enzymes de modification sont regroupées en trois catégories : les acyltransférases (voir § 3.2.2.2 pour celles de *Pseudomonas*), les phosphoryltransférases et les nucléotidyltransférases. Ces enzymes confèrent une résistance élevée aux antibiotiques qu'elles modifient. Elles sont portées par des transposons et se transmettent rapidement d'une bactérie à l'autre. C'est le cas de l'aminoglycoside phosphorylase APH(3')-I, portée par un plasmide et retrouvée chez 46 % des bactéries Gram négatif résistantes aux aminoglycosides, qui présente des similitudes avec une enzyme dont le gène est porté par le chromosome bactérien de *Streptomyces fradiae* (Shaw & al, 1993).

Des mutations au sein de gènes codant pour ces enzymes de modification peuvent conduire à une extension du spectre d'activité. Pour exemple, l'aminoglycoside acétyltransférase AAC(6')-Ib-cr présente des mutations qui lui confère la capacité de modifier les groupements amine du cycle pipérazine des fluoroquinolones (Robicsek & al, 2006). De même, un variant d'AAC(6')-Ib retrouvé dans des souches cliniques, montre une extension de résistance à la plupart des aminoglycosides, et aux fluoroquinolones, de structure éloignée, de par l'élargissement de son site actif (Maurice & al, 2008).

2.3. La résistance adaptative

La résistance adaptative est définie par Fernandez & Hancock en 2012 comme étant l'augmentation temporaire de la capacité de survie d'une bactérie en présence d'antibiotiques, résultant de l'altération de gènes et/ou de l'expression des protéines en réponse à des signaux environnementaux (gradient de concentration, concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques, etc.) (Fernández & Hancock, 2012). À la différence de la résistance naturelle et de la résistance acquise qui résultent de précédents contacts de la bactérie avec l'antibiotique, la résistance adaptative est une réponse directe au premier contact d'un antibiotique, elle est donc dépendante de la présence d'antibiotiques.

La résistance adaptative est transitoire et ne résulte donc pas de mutations génétiques qui confèrent une résistance permanente. Elle est cependant dépendante de la durée d'exposition à l'antibiotique et permet de distinguer deux mécanismes impliqués dans le développement de la résistance chez les bactéries (Sandoval-Motta & Aldana, 2016) (**Fig. 19**):

- ✚ **la réponse dite « rapide et transitoire » (FTM)** : l'exposition à de faibles concentrations d'antibiotiques entraîne un développement « immédiat » de la résistance qui disparaît en absence d'antibiotiques. Cette réponse réversible découlerait de la méthylation de l'ADN ou encore d'un taux élevé de mutations ponctuelles,
- ✚ **la réponse dite « lente et stable » (SSM)** : un contact prolongé avec l'antibiotique entraîne l'apparition graduelle et cumulative de mutations, ainsi que la duplication et l'amplification de gènes qui confèrent une résistance permanente.

La résistance adaptative est donc un pont entre la résistance naturelle et la résistance acquise, permettant ainsi à la bactérie de développer des systèmes de défense en adéquation avec son environnement.

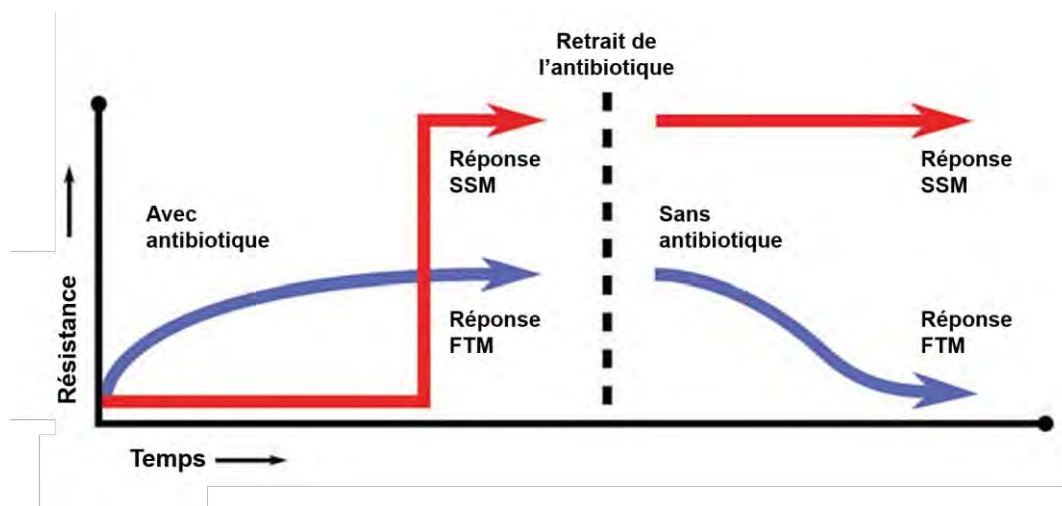


Figure 19 : Acquisition continue et discontinue de la résistance. En fonction des signaux environnementaux et de la durée d'exposition aux agents antibactériens, le niveau de résistance peut varier de façon graduelle jusqu'à l'obtention d'une réponse stable et permanente (réponse SSM, en rouge) ou de façon rapide avec une réponse transitoire (réponse FTM, en violet) qui disparaît après le retrait de l'antibiotique. (Adapté de Sandoval-Motta & Aldana, 2016, Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine).

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la résistance adaptative (Olivares & al, 2013) (Fig. 20):

- ✚ **la persistance** : elle correspond à la capacité de survie d'une sous-population bactérienne dans des conditions dans lesquelles la croissance et la survie du reste de la population est inhibée par un antibiotique donné. Les bactéries persistantes sont regroupées en deux catégories :
 - **les bactéries persistantes de type I** : ce sont des sous-populations bactériennes qui restent en phase stationnaire en présence d'un antibiotique, contrairement au reste de la population. Elles constituent des bactéries « survivantes » qui permettent de relancer la génération d'une nouvelle population. Le type I est associé au système toxine-antitoxine (TA) et à l'expression des gènes *hipA-hipB* dont la surexpression inhibe la croissance cellulaire et confère ainsi la résistance aux antibiotiques par formation de cellules persistantes.
 - **les bactéries persistantes de type II** : elles correspondent à une sous-population bactérienne dont la croissance est ralentie en présence d'antibiotiques. Le type II implique l'expression des gènes *hipQ*.
- ✚ **les biofilms** : il s'agit de populations bactériennes structurées et englobées au sein d'une matrice contenant des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire et fixée sur une surface naturelle ou artificielle. Ils constituent avec le mode de vie planctonique (par cellules individualisées), les deux modes de vie des bactéries. La formation du biofilm dépend de signaux environnementaux et l'état métabolique des bactéries au sein du biofilm est variable, ceci étant dû à la disponibilité de l'oxygène et des nutriments, il va donc jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques. La matrice extracellulaire va également moduler l'activité de l'antibiotique d'une part, en diminuant la diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm et d'autre part, en le séquestrant à la surface du biofilm.
- ✚ **le « swarming » ou prolifération rapide** : il s'agit d'une propagation due à un mouvement rapide de cellules hyperflagellées qui permet une colonisation rapide des surfaces au cours de l'infection. La différenciation de ces cellules spécialisées implique le quorum sensing. Elles sont résistantes aux antibiotiques, notamment à

cause de la surexpression de pompes à efflux, au cours de leur différenciation. Le mécanisme de résistance aux antibiotiques de ce phénotype transitoire est cependant encore loin d'être compris.

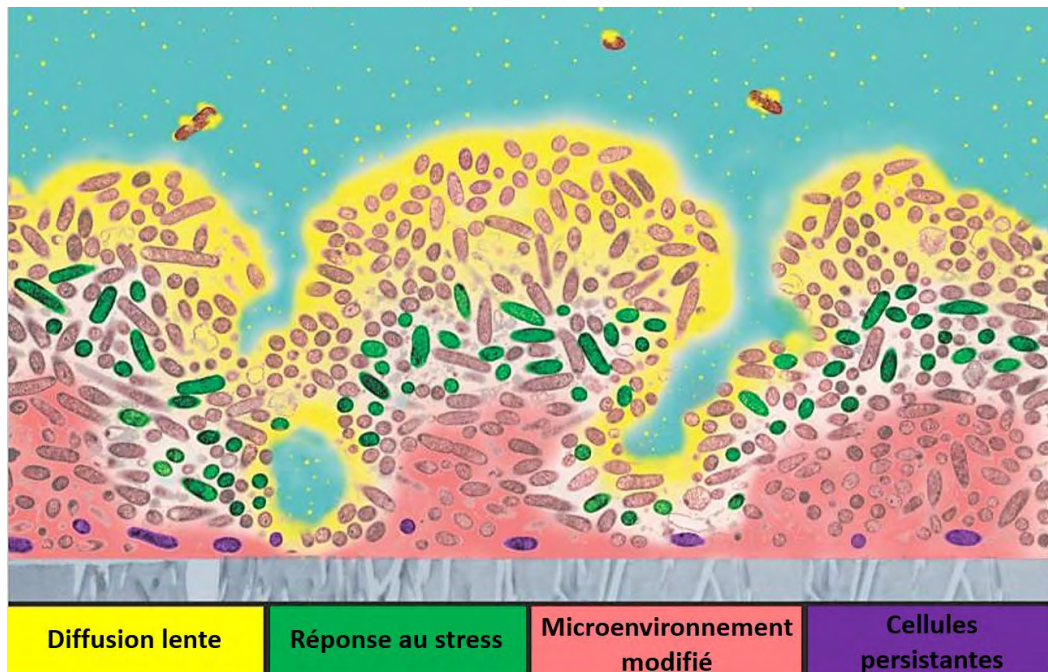


Figure 20 : Les mécanismes impliqués dans la résistance adaptative. Le biofilm, formé à l'interface liquide (en bleu) –solide (en gris) est mis en contact avec un antibiotique (en jaune). Les bactéries présentes à la base du biofilm (en rose) sont moins accessibles et donc plus résistantes à l'antibiotique que les bactéries de surface (en vert) qui réagissent au stress. Certaines bactéries (en violet), peuvent devenir persistantes. (Adapté de Chambless & al, 2006, Applied and Environmental Microbiology).

3. La résistance aux antibiotiques chez une bactérie multirésistante: *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. *Pseudomonas aeruginosa* : pathogénicité et épidémiologie

Encore appelé « bacille pyocyanique » à cause du pigment bleu-vert qu'elle produit (la pyocyanine), *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 21) est une bactérie Gram négatif normalement présente dans les sols et dans les environnements aqueux. Isolée chez des patients pour la première fois en 1882 par Gessard, la bactérie, qui est également capable de se développer sur des supports artificiels tels que les outils médicaux (sonde, tube, cathéter, etc.), peut devenir un pathogène opportuniste sous certaines conditions et constitue donc une cause fréquente de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier. C'est le second pathogène le plus fréquemment associé aux affections respiratoires et aux infections cutanées et elle constitue le troisième pathogène responsable d'infections nosocomiales en France (11,1 %), derrière *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Rapport 2012 de l'ENP en HAD, InVS).



Figure 21 : Bactéries *Pseudomonas aeruginosa* cultivées pendant trois jours dans l'espace (NASA, 2011).

P. aeruginosa touche particulièrement les individus immunodéprimés tels que les patients atteints de neutropénie, de mucoviscidose, du SIDA ou encore les patients en soins intensifs tels que les grands brûlés ou les patients en rémission post-chirurgicale (Lyczak & al, 2000). La bactérie est notamment responsable d'infections pulmonaires, de septicémies, de surinfections de plaies, d'escarres ou de brûlures, de folliculites et d'otites externes, de conjonctivites et de kératites chez les porteurs de lentilles et d'infections urinaires chez les personnes porteuses d'une sonde.

L'émergence et la dissémination rapide de bactéries multirésistantes, liées à l'usage abusif des antibiotiques, constitue un frein aux traitements des infections liées à *P. aeruginosa* et l'arsenal thérapeutique est de plus en plus restreint, à cause de la capacité d'adaptation de la bactérie qui lui permet de développer rapidement des systèmes de résistance. En France, de 2005 à 2012, la résistance est passée d'environ 9% à 14% pour les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime), de 14% à 18% pour les carbapénèmes (imipénème et méropénème). La résistance aux fluoroquinolones est évaluée en 2012 à 22% et la résistance aux aminoglycosides à 20% (Rapport l'EARSS, 2005 ; Rapport de l'EARSS, 2012).

La résistance à un antibiotique donné est souvent associée à la résistance à d'autres antibiotiques. La multirésistance, définie comme étant la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, notamment les β -lactamines (céphalosporines et carbapénèmes), les aminoglycosides et les fluoroquinolones, est en augmentation constante. Elle est passée de 7,4% en 2005 à 14,7% en 2012 (Rapport l'EARSS, 2005 ; Rapport de l'EARSS, 2012). L'étude d'isolats cliniques résistants ou non à la pipéracilline, chez des patients atteints de pneumonie acquise sous ventilation (VAP), a montré que les souches résistantes présentaient également une capacité de résistance à la ticarcilline, aux combinaisons pipéracilline-tazobactam et ticarcilline-clavulanate, à la ceftazidime, à l'imipénème, à la ciprofloxacine et à l'amikacine (Trouillet & al, 2002) (**Fig. 22**). Contrairement aux souches sensibles à la pipéracilline, dont 21,8% étaient résistantes à la ciprofloxacine et 16,8% à la ticarcilline, 70,6% des souches résistantes à la pipéracilline étaient résistantes à la ciprofloxacine et 91,2% à la ticarcilline.

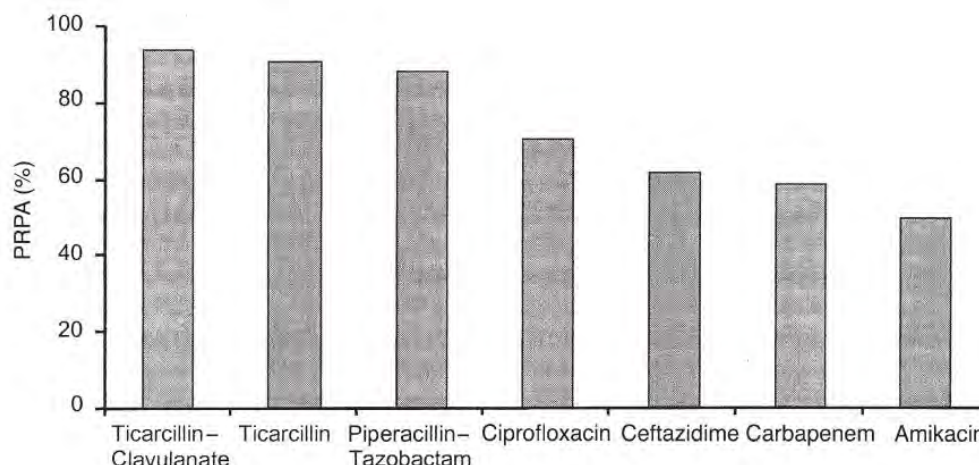


Figure 22 : Résistance croisée et co-résistance à différents antibiotiques chez des isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* résistants à la piperacilline (PRPA). (McGowan, 2006, American Journal of Medicine).

L'apparition rapide de souches multirésistantes de *P. aeruginosa* rend les traitements difficiles et coûteux. À cause de la limitation des options thérapeutiques, le traitement des infections nécessite dans certains cas le recours à des agents thérapeutiques présentant une toxicité plus importante, notamment les polymyxines (polymyxine B et colistine). Des souches résistantes ont cependant émergé, remettant ainsi en question l'efficacité des traitements (Lee & al, 2011). Des études *in vitro* ont néanmoins montré que la combinaison polymyxine B/rifampicine et/ou imipénème restaure l'effet bactéricide, mais l'utilité clinique de cette combinaison n'est pas établie, notamment à cause de la néphrotoxicité des polymyxines (Landman & al, 2005).

3.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa possède une résistance naturelle à plusieurs familles d'antibiotiques, grâce à des mécanismes multifactoriels impliquant sa faible perméabilité membranaire, l'expression constitutive ou induite de plusieurs pompes d'efflux et d'enzymes endogènes

d'inactivation des antibiotiques. En plus des gènes impliqués dans la résistance naturelle, *P. aeruginosa* est capable d'acquérir des éléments de résistance importés à partir d'éléments mobiles par transfert de gènes, de surexprimer les gènes naturels grâce à des mutations au niveau des gènes régulateurs ou encore de modifier les cibles des antibiotiques.

3.2.1. La perméabilité de la membrane externe

La membrane externe de *P. aeruginosa* constitue l'élément principal de la résistance aux antibiotiques de la bactérie. C'est une barrière semi-perméable qui contrôle la pénétration des molécules hydrophiles grâce à des porines. La membrane externe de *P. aeruginosa* est 10 à 100 fois moins perméable que celle d'*E. coli* mais sa limite d'exclusion est plus large, permettant le passage de molécules dont le poids moléculaire peut aller jusqu'à 3 000 Da contre 500 Da pour *E. coli*. Le contraste entre la faible perméabilité membranaire et la large limite d'exclusion s'explique par la présence d'une porine majoritaire, OprF, dont le diamètre a été décrit comme étant supérieur à celui des porines d'*E. coli*. Cependant, OprF existe sous deux conformations, une conformation fermée monomérique et une conformation ouverte trimérique. Seule une faible proportion d'OprF (5 %) est exprimée en conformation ouverte, ce qui réduit la perméabilité membranaire (Sugawara & al, 2012). De plus, *P. aeruginosa* exprime un certain nombre de porines permettant le passage de petites molécules (OprD, OprB) (**Fig. 23**) (Breidenstein & al, 2011).

OprF est la principale porine non spécifique de *P. aeruginosa*. Cependant, même si des souches cliniques déficientes en OprF présentent des phénotypes de résistance, OprF ne semble pas contribuer de façon significative à la résistance aux antibiotiques (Pumbwe & al, 1996). Elle semble être principalement impliquée dans l'adhésion aux cellules de l'hôte au cours du processus infectieux (sécrétion de l'adhésine LecA), dans la sécrétion des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (ExoT, ExoS) et dans la formation de biofilms en anaérobiose (Krishnan & al, 2012).

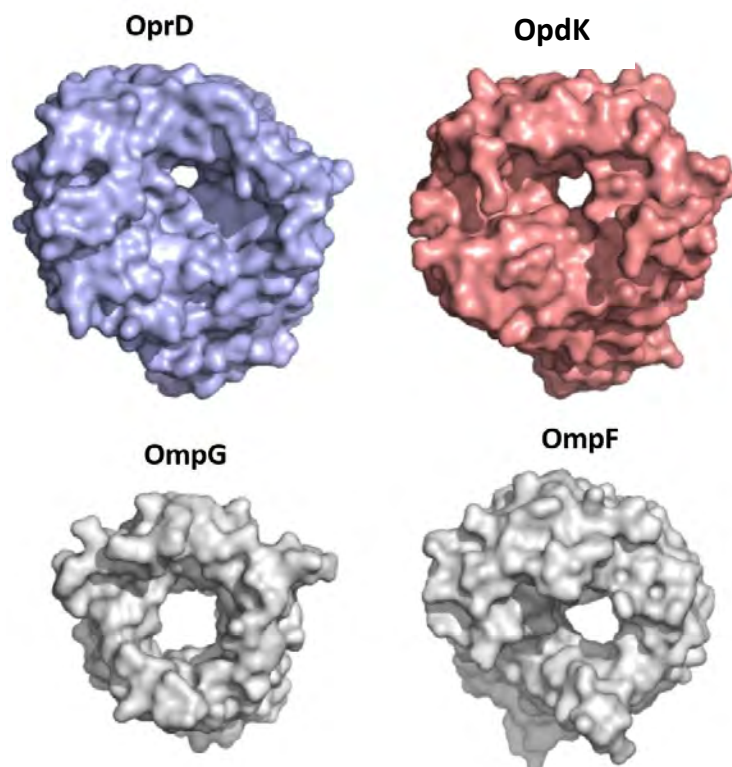


Figure 23 : Comparaison de la taille des pores (vue extracellulaire) de deux porines sélectives (OprD et OpdK de *P. aeruginosa*) et de deux porines non sélectives (OmpG et OmpF d'*E. coli*). Le diamètre réduit des porines sélectives restreint l'entrée des substrats en fonction de leur taille. (Eren & al, 2012, PLoS Biology). Code PDB OprD : 4FOZ ; OpdK : 3SYS ; OmpG : 2IWW et OmpF : 4LSF.

OprD (renommée OccD1) est quant à elle, une porine spécifique qui contribue à l'entrée d'acides aminés basiques et de β -lactamines de faible poids moléculaire, notamment des carbapénèmes (imipénème) (Trias & Nikaido, 1990 ; Trias & Nikaido, 1990). OprD est un élément majeur de la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* car, en présence de carbapénèmes, de salicylate, ou de MexT (un activateur de l'expression de la pompe à efflux MexEF-OprN) (**Fig. 24**), son expression est réprimée (inactivation du promoteur, synthèse de protéines tronquées, etc.) (Ochs & al, 1999 ; Köhler & al, 1999).

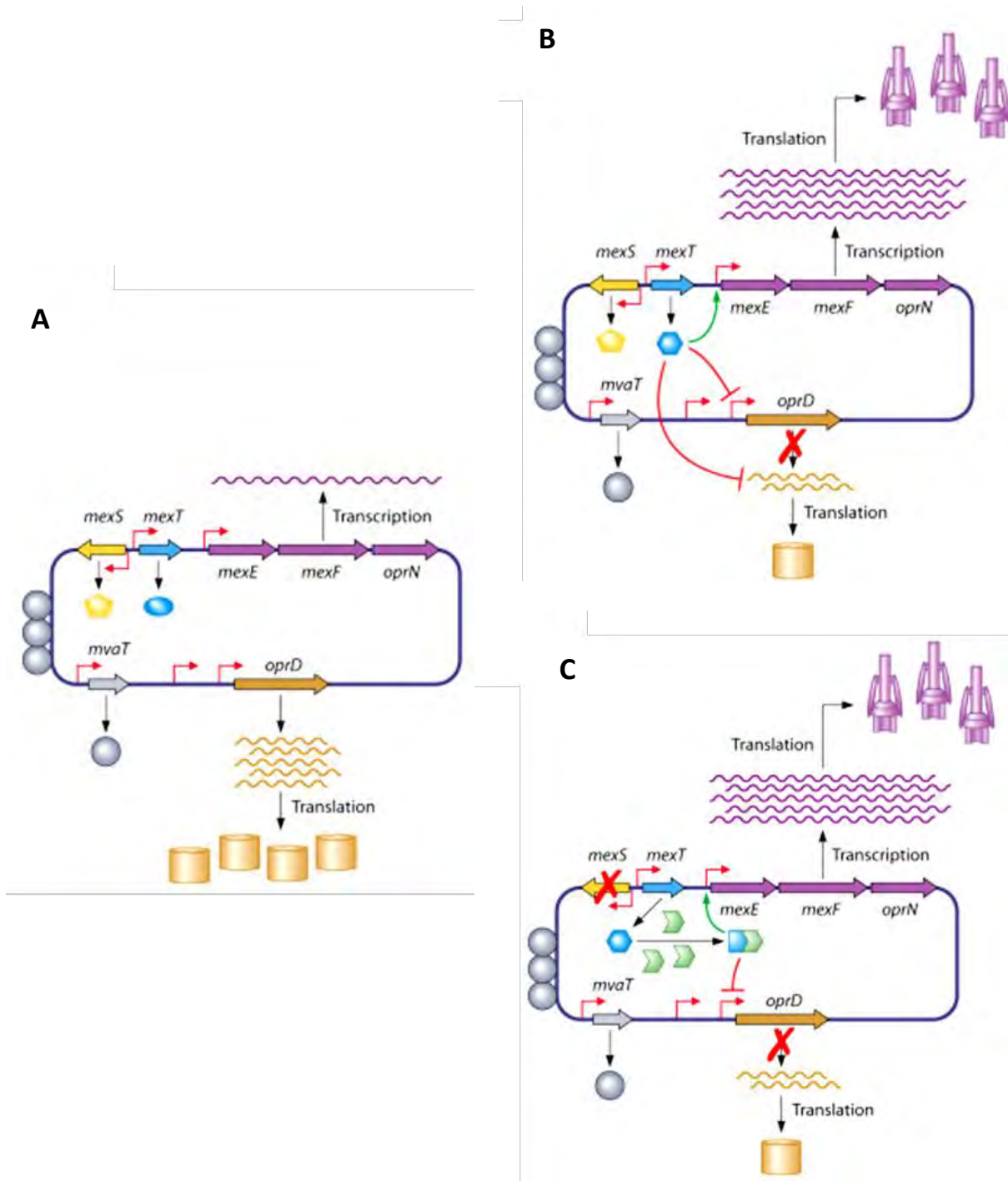


Figure 24 : Modèles de co-régulation de l'expression de la pompe à efflux MexEF-OprN et de la porine OprD chez *P. aeruginosa*. Chez la souche sauvage, MexT (en bleu) est exprimé sous forme inactive (ellipse bleue), l'opéron MexEF-OprN (en violet) est donc faiblement exprimé et OprD (en orange) est exprimé avec un taux suffisant pour assurer les fonctions cellulaires (A). Chez des mutants *nfxC* (B) ou chez des souches déficientes en MexS (en jaune), un répresseur de MexT (C), MexT est activé (hexagone bleu). Le régulateur active la surexpression de l'opéron MexEF-OprN (flèche verte) et inhibe l'expression d'OprD. MvaT est un régulateur négatif de l'expression de l'opéron MexEF-OprN, indépendant de MexT et MexS, dont l'inactivation entraîne une surexpression de la pompe. (Adapté de Lister & al, 2009, Clinical Microbiology Review).

Le nombre de porines à la surface de la bactérie est ainsi réduit, limitant l'accès des antibiotiques à l'intérieur de la cellule et conférant ainsi à la bactérie la résistance aux carbapénèmes (**Fig. 25**). Des mutants déficients en OprD sont 4 à 32 fois plus résistants au méropénème et 4 à 16 fois plus résistants à l'imipénème et 8 à 32 fois plus résistants au doripénème, avec des CMI comprises entre 2 et 4 mg/L pour le méropénème (Lister & al, 2009). Des mutations d'OprD sont également impliquées dans la résistance aux carbapénèmes. Les boucles extracellulaires 2 et 3 (voir **Fig.13**) sont nécessaires pour l'entrée et la fixation des carbapénèmes, notamment de l'imipénème. La délétion de ces boucles ou la substitution des résidus T103 (T103S), K115 (K115T) et F170 (F170L) peut entraîner une résistance à l'imipénème (Li & al, 2012 ; Ocampo-Sosa & al, 2012). Une autre porine spécifique, OprE est absente chez les mutants de *P. aeruginosa* résistants aux quinolones et aux céphalosporines, mais son rôle dans la résistance n'a pas été décrit à ce jour (Yamano & al, 1990). OprR est une porine récemment découverte dont l'expression semble régulée par l'exposition aux composés ammonium quaternaire mais son implication dans la résistance clinique n'est pas défini (Tabata & al, 2003).

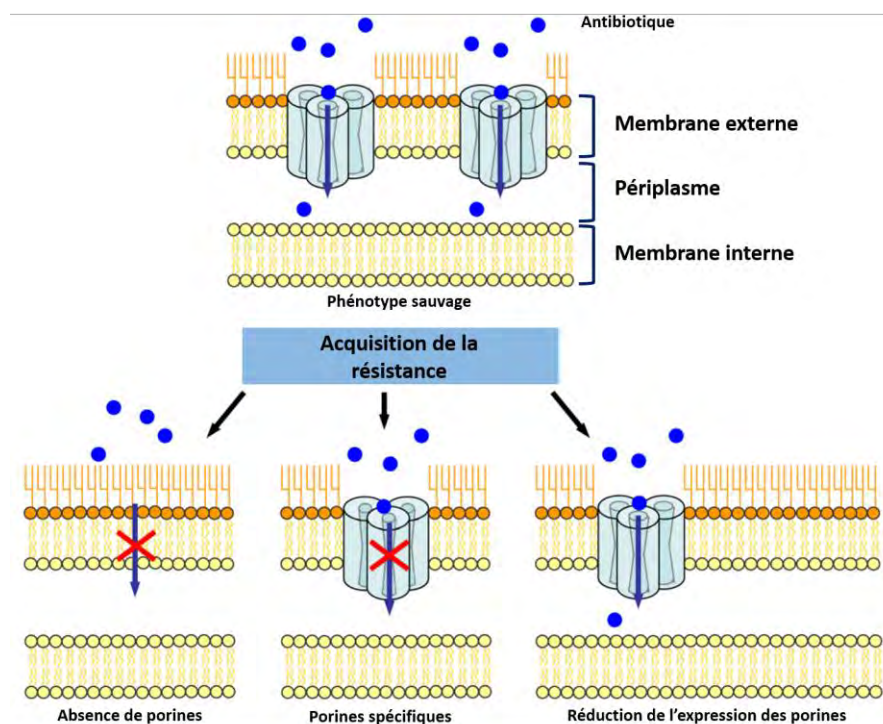


Figure 25 : Exemples de mécanismes impliqués dans la résistance liée à des modifications d'expression des porines. (Adapté de Fernandez & Hancock, 2012, Clinical Microbiology Reviews).

3.2.2. La résistance médiée par les enzymes d'inactivation des antibiotiques

3.2.2.1. La réponse aux β -lactamines

Les β -lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane en se liant aux transpeptidases (PLP ou PBP) (§ 1.2.1.1). Les principales β -lactamines utilisées dans les traitements anti-*Pseudomonas* comprennent les pénicillines (ticarcilline, pipéracilline), les combinaisons pénicillines-inhibiteurs (pipéracilline-tazobactam, ticarcilline-clavulanate), les céphalosporines (ceftazidime, céfépime), les monobactames (aztréonam), et les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème). *P. aeruginosa* est naturellement résistante à la plupart des β -lactamines notamment grâce à la présence d'une céphalosporinase inductible, AmpC.

AmpC est une β -lactamase de classe C et constitue avec l'oxacillinase PoxB (β -lactamase de classe D), les deux β -lactamases endogènes de *P. aeruginosa*. AmpC est codée par un gène dont l'expression s'effectue sous le contrôle d'un système de régulation de type LysR (appelé *ampR* chez *P. aeruginosa*). Cette famille de régulateurs dérive du gène *lysR*, codant pour un activateur transcriptionnel du gène *lysA*, qui code pour une enzyme de modification du diaminopimelate en lysine. Le taux d'expression basal d'AmpC est faible chez *P. aeruginosa*, cependant l'interaction des β -lactamines avec le système LysR, ainsi que des mutations du gène régulateur *ampR* conduisent à la surexpression du gène *ampC* (Bonomo & Szabo, 2006). Cette surexpression de la β -lactamase AmpC est observée chez des mutants de *P. aeruginosa* résistants à la ticarcilline, à la pipéracilline et à des céphalosporines à large spectre (ceftazidime). Certaines β -lactamines, telles que les benzyl-pénicillines (amoxicilline), les céphalosporines à spectre étroit et les carbapénèmes contribuent à la surexpression du gène *ampC* tandis que les uréidopénicillines (pipéracilline) et les céphalosporines à large spectre sont des inducteurs plus faibles de l'expression du gène *ampC*.

Les carbapénèmes, dont l'entrée dans la cellule dépend principalement de la disponibilité et de la présence de la porine OprD (voir § 3.2.1), présentent un fort pouvoir inducteur de l'expression du gène *ampC*. Ils ne sont cependant pas substrats de la céphalosporinase, ils sont pris en charge par des β -lactamases pour la plupart acquises par

transfert de gènes, notamment des β -lactamases de classes A (GSE), de classe B (IMP, VIM, SPM et GIM) et de classe D (OXA-40 et OXA-198) (Walsh, 2010 ; Potron & al, 2015) et par les pompes à efflux (la résistance liée à l'efflux sera développée au paragraphe **3.2.3**). La ceftazidime quant à elle, n'active pas l'expression du gène *ampC* mais est un substrat de la céphalosporinase AmpC, qui empêche ainsi l'inhibition de la transpeptidase PLP3.

Le gène *ampC* est normalement porté par le chromosome bactérien, mais des mutations au sein du chromosome bactérien ou encore le transfert horizontal de gènes grâce à des plasmides a permis l'acquisition de gènes codant pour des BLSE (β -lactamases à Spectre Large) (voir § **2.2.3.1**) et des céphalosporinases à spectre large (ESAC). En plus des β -lactamines classiques, ces céphalosporinases semblent cependant réduire uniquement la sensibilité aux carbapénèmes (imipénème, méropénème) et à la céfépime et leur expression semble être induite par la présence de ces antibiotiques (Rodríguez-Martínez & al, 2009 ; Rodríguez-Martínez & al, 2009). Ces enzymes diffèrent des céphalosporinases sauvages par la présence de substitutions ou d'insertions d'acides aminés au niveau de quatre régions, essentiellement localisées autour du site actif : les boucles Ω et R2, les hélices H10 et H2 et l'extrémité C-terminale de la protéine (**Fig. 26**). Même si leur capacité d'hydrolyse des carbapénèmes reste faible ($0,5 \leq K_{cat}/K_m \leq 6$ pour l'imipénème contre $35 \leq K_{cat}/K_m \leq 860$ pour la pénicilline G), la résistance augmente d'un facteur 4 pour l'imipénème et d'un facteur 4 à 16 pour la céfépime, en présence d'ESACs.

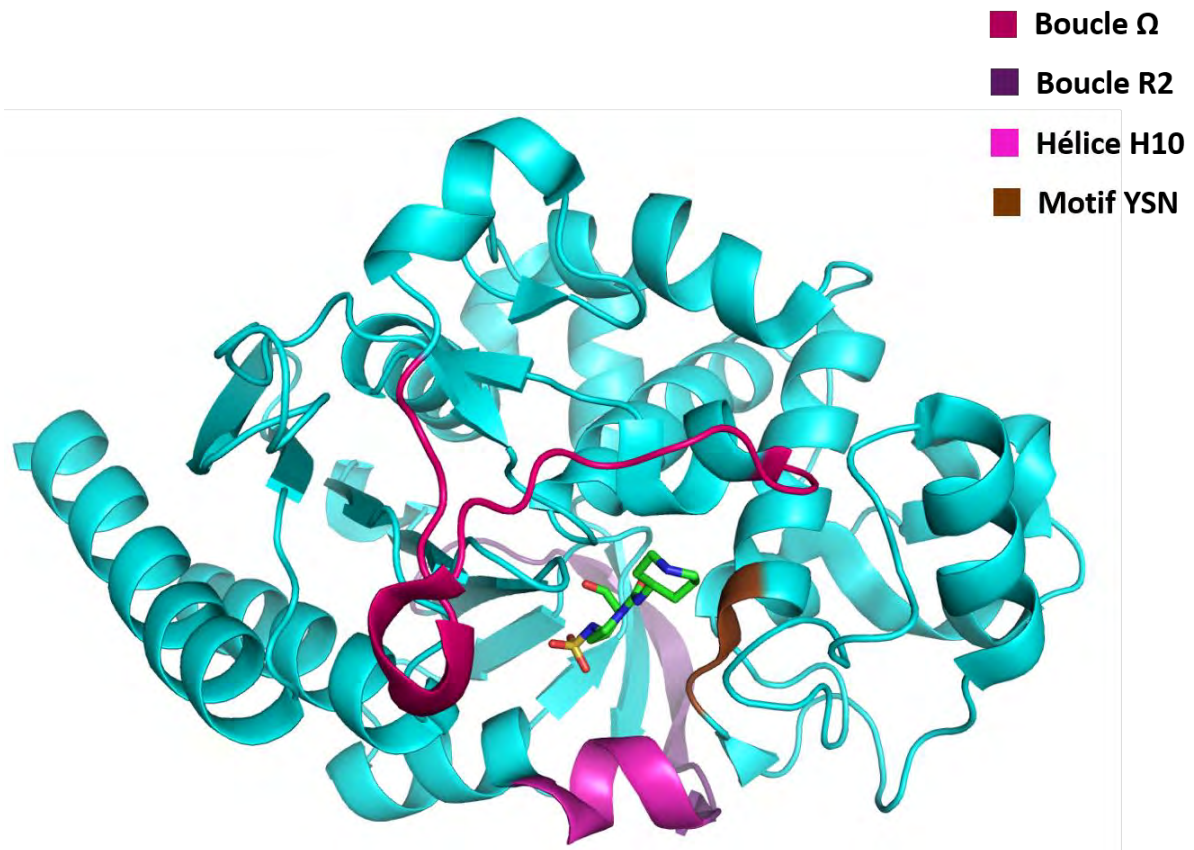


Figure 26 : Structure de la β -lactamase AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* (en bleu) en complexe avec un inhibiteur (en vert). Les différentes régions du site actif dont la mutation est impliquée dans la résistance sont indiquées. Code PDB : 2WZZ. (Berrazeg & al, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

3.2.2.2. La réponse aux aminoglycosides

Un certain nombre d'aminoglycosides, notamment la tobramycine, la gentamicine, et l'amikacine, sont traditionnellement employés dans le traitement des infections liées à *P. aeruginosa*, notamment chez des patients atteints de mucoviscidose (Poole, 2011). Les aminoglycosides ciblent principalement la synthèse protéique et le développement de la résistance est lié à l'acquisition d'enzymes de modification (EMA) (Fig. 27), de méthylases de l'ARN ribosomal et à l'efflux (Poole, 2005). Seules les EMA et les méthylases seront décrites dans ce paragraphe, l'efflux étant d'écrit au paragraphe suivant (§ 3.2.3).

Les aminoglycosides peuvent subir une acétylation, une phosphorylation ou une adénylation au niveau de leurs groupements amine ou hydroxyle, en position 1-, 3-, 6'- et 2'. Les enzymes les plus fréquentes chez les souches cliniques résistantes sont les 3-N-aminoglycoside acétyltransférases [AAC(3)], les 6'-N-aminoglycoside acétyltransférases [AAC(6')] et les aminoglycosides 2'-nucléotidyltransférases [ANT(2')]. Ces enzymes confèrent une résistance à la gentamicine et à la tobramycine mais pas à l'amikacine, qui est prise en charge par d'autres enzymes ([ANT(4')]) (Poole, 2005). L'APH (3')-IIb est une phosphoryltransférase endogène codée par le gène *aphA*, responsable de la résistance naturelle de *P. aeruginosa* à la kanamycine. La forme APH (3')-II est prédominante chez les isolats cliniques résistants à la kanamycine. Les aminoglycosides, notamment la tobramycine, en concentrations sub-inhibitrices, entraîne également la formation de biofilms (Hoffman & al, 2005).

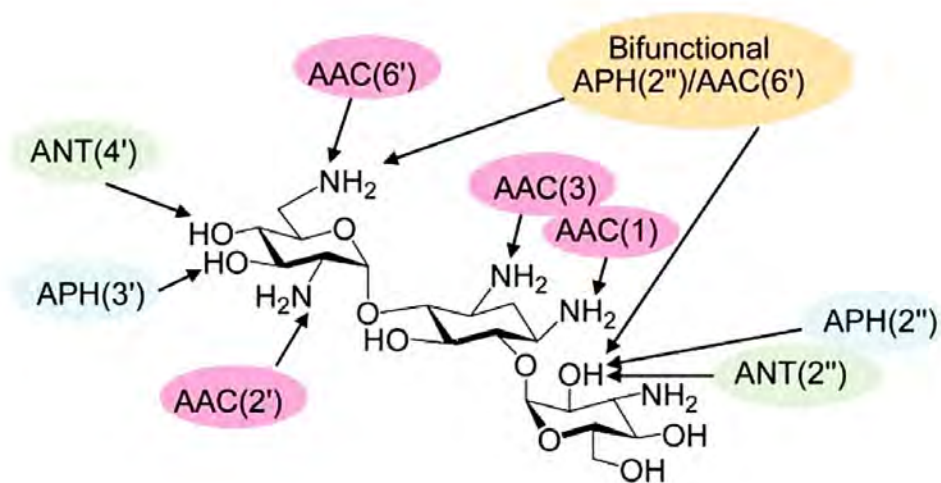


Figure 27 : Illustration des sites modifiés par les enzymes de modification des aminoglycosides. Les acétyltransférases sont représentées en rose, les phosphoryltransférases en bleu, les nucléotidyltransférases en vert. Les enzymes bi-fonctionnelles (acétyl- et phosphoryltransférases) sont représentées en orange. Les positions des groupements modifiés sont indiquées entre parenthèses. (Hainrichson & &l, 2008, Organic and Biomolecular Chemistry).

La résistance aux aminoglycosides implique également la méthylation de l'ARN ribosomal 16S, empêchant ainsi la fixation des antibiotiques au niveau du site A de la sous-unité 30S. *P. aeruginosa* possède plusieurs méthylases, notamment RmtA, RmtB, RmtD et ArmA (Poole, 2011). Le gène *rmtA* est porté par des éléments mobiles (Yamane & al, 2004) et RmtA présente 40% d'identité de séquence avec RmtB. RmtB est fréquemment retrouvée chez des isolats cliniques de patients brésiliens résistants à l'imipénème, où elle est co-exprimée avec la métallo- β -lactamase SPM-1 (Doi & al, 2007). ArmA est également co-exprimée avec une métallo- β -lactamase, IMP-1 (Gurung & al, 2010).

3.2.3. L'efflux actif

En plus des systèmes précédemment décrits, *P. aeruginosa* met en jeu des systèmes d'efflux actif afin de prévenir l'accumulation des composés toxiques et notamment des antibiotiques à l'intérieur de la cellule. Ces systèmes d'efflux, classés en cinq familles (§ 2.2.1.2), sont impliqués à la fois dans la résistance intrinsèque et la résistance acquise aux antibiotiques mais également dans l'efflux de biocides, de colorants, de détergents et de solvants organiques. Même si l'analyse du génome de *P. aeruginosa* a révélé la présence des cinq familles, la majorité des pompes d'efflux appartiennent à la famille des transporteurs RND (Stover & al, 2000). Cette famille de transporteurs sera décrite de façon plus exhaustive au paragraphe 4. On dénombre 12 pompes d'efflux chez *P. aeruginosa* et 5 d'entre elles ont été décrites comme étant impliquées dans la résistance aux antibiotiques chez des isolats cliniques : MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ et MexJK-OprM (Lister & al, 2009). La pompe MexAB-OprM est exprimée de façon constitutive, l'expression des autres pompes étant induite par des signaux environnementaux. Les substrats de ces pompes varient d'une pompe à l'autre et sont résumés dans le **tableau 1**.

Opéron	Composant	Régulateur		Substrat	
		Primaire	Secondaire	Antibiotiques	Autres composés
<i>mexAB-oprM</i>	MexA MexB OprM	MexR NalD	NalC	Fluoroquinolones, β -lactamines, inhibiteurs de β -lactamases, tétracycline, chloramphénicol, macrolides, novobiocine, triméthoprime, sulfonamides	Biocides (ex: Triclosan) détergents, colorants, homosérine lactones (HSL) hydrocarbures aromatiques
<i>mexCD-oprJ</i>	MexC MexD OprJ	NfxB		Fluoroquinolones, β -lactamines, tétracycline, chloramphénicol, macrolides, novobiocine, triméthoprime	Biocides (ex: Triclosan) détergents, colorants, hydrocarbures aromatiques
<i>mexEF-oprN</i>	MexE MexF OprN	MexT	MexS MvaT	Fluoroquinolones, chloramphénicol, triméthoprime	Biocides (ex: Triclosan), hydrocarbures aromatiques
<i>mexXY</i>	MexX MexY OprM/Opm (B,G,H et/ou I)	MexZ		Fluoroquinolones, β -lactamines, tétracycline, aminoglycosides, chloramphénicol, macrolides,	
<i>mexJK</i>	MexJ MexK OprM/OpmH	MexL		Tétracycline, Erythromycine	Biocides (ex: Triclosan)
<i>mexGHI-opmD</i>	MexG MexH MexI OpmD	SoxR		Fluoroquinolones	Vanadium
<i>mexVW</i>	MexV MexW OprM	non identifié		Fluoroquinolones, chloramphénicol, tétracycline, érythromycine	
<i>mexPQ-opmE</i>	MexP MexQ OpmE	non identifié		Fluoroquinolones, chloramphénicol, tétracycline, macrolides	
<i>mexMN</i>	MexM MexN OprM	non identifié		Chloramphénicol, thiamphénicol	
<i>triABC</i>	TriA TriB TriC OpmH	non identifié			Triclosan

Tableau 1 : Caractéristiques des pompes d'efflux de la famille RND chez *P. aeruginosa*. Les complexes bipartites MFP-RND sont indiqués en bleu et les OMFs correspondantes sont indiquées en rouge, vert et violet. Les OMFs communes à plusieurs pompes sont indiquées par la même couleur. (Adapté de Lister & al, 2009, Clinical Microbiology Review).

La résistance liée à ces pompes implique souvent des mutations au niveau des systèmes de régulation qui entraîne la surexpression des pompes à efflux. Mais cette surexpression résulte principalement de l'induction de l'expression des pompes en réponse aux signaux environnementaux. C'est le cas de la pompe MexXY-OprM dont l'expression est

induite en présence d'aminoglycosides (gentamicine), de macrolides (érythromycine) et de tétracyclines (Masuda & al, 2000) ou encore de la pompe MexEF-OprN dont l'expression est induite par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la pompe MexCD-OprJ dont l'expression est induite par des agents déstabilisants de la membrane (Lister & al, 2009 ; Morita & al, 2014). Les gènes codant pour certaines pompes spécifiques, notamment la pompe MexCD-OprJ, sont portés par des éléments mobiles (transposons, intégrons) ou des plasmides porteurs de gènes de résistance supplémentaires (Poole, 2005).

Les régulateurs impliqués dans l'expression des pompes à efflux, qui peuvent jouer un rôle répresseur ou activateur, sont regroupés en deux classes : les régulateurs locaux (ou primaires) situés à proximité des gènes et qui contrôlent directement leur expression et les régulateurs globaux (ou secondaires) impliqués dans plusieurs voies de régulation et qui contrôlent l'expression des gènes de façon indirecte. Ces régulateurs acquièrent facilement des mutations qui confèrent à la bactérie une résistance aux antibiotiques (**Fig. 28**) (Fernández & Hancock, 2012).

3.2.3.1. Les régulateurs locaux

Une surexpression de la pompe MexAB-OprM a été décrite chez des mutants *nalB* (souche de *P. aeruginosa* résistante à l'acide nalidixique) résistants aux β -lactamines (K Poole & al, 1996 ; Higgins & al, 2003). Cette surexpression est due à des mutations du gène *mexR* localisé en amont de l'opéron *mexAB-oprM*, qui code pour un répresseur de la famille MarR (§ 2.2.1.2).

La pompe MexCD-OprJ est régulée de façon similaire par le produit d'expression du gène *nfxB*, qui est adjacent à l'opéron *mexCD-OprJ* mais orienté dans le sens opposé. La surexpression de cette pompe a cependant des effets délétères sur la bactérie car elle entraîne la répression de l'expression d'autres systèmes de résistance (pompes d'efflux, facteurs de virulence) (voir § 3.2.4.1), rendant ainsi la bactérie plus sensible (Fernández & Hancock, 2012).

Un autre régulateur appartenant à la famille TetR, MexZ, réprime quant à lui l'expression de la pompe MexXY en se liant à la région intergénique comprise entre les gènes *mexZ* et *mexX*. Des mutations de MexZ conduisent à l'apparition de résistance modérée aux aminoglycosides chez des isolats cliniques retrouvés chez des patients atteints de mucoviscidose (Vogne & al, 2004).

La pompe MexEF-OprN quant à elle, est plus souvent sujette à une activation qu'à une répression. Des mutants de phénotype *nfxC* (souche de *P. aeruginosa* résistante aux quinolones) résistants à une fluoroquinolone, la norfloxacin, présentent une surexpression de cette pompe liée à des mutations qui entraînent l'activation du régulateur MexT. MexT est un régulateur de la famille LysR (§ 3.2.2.1) codé par un gène situé en amont de l'opéron *mexEF-oprN*, inactif chez les souches sauvages de *P. aeruginosa*, notamment grâce à l'insertion de 8 nucléotides (8-bp) au sein du gène *mexT*. Les mutants *nfxC* présentent des mutations additionnelles de ce gène ou encore la délétion de l'insertion 8-bp, qui contribuent à l'expression de MexT sous forme active (Maseda & al, 2000). Il a également été montré que des mutations de MexS, dont l'expression est régulée par MexT, sont impliquées dans l'apparition du phénotype *nfxC* mutant (Richardot & al, 2016). MexS est une oxydoréductase dont l'inactivation permet l'activation de l'opéron *mexEF-oprN* par MexT.

3.2.3.2. Les régulateurs globaux

Chez *P. aeruginosa*, l'expression de la pompe MexAB-OprM implique d'autres systèmes de régulations, en plus de MexR. Des mutants *nalC*, résistants grâce à la surexpression de cette pompe, ne présentent aucune mutation au sein du gène *mexR*. Ces mutants ont permis d'identifier deux gènes supplémentaires impliqués dans la régulation de l'expression de la pompe MexAB-OprM, un répresseur de la famille TetR codé par le gène *nalC* (locus PA3721) et ArmR (locus PA3719). Des mutations du gène *nalC* entraîne la surexpression de l'opéron PA3719-PA3720 chez des souches cliniques, opéron qui est normalement réprimé par ce régulateur, conduisant à l'apparition du phénotype de multirésistance *nalC* (Cao & al, 2004 ; Sobel & al, 2005). ArmR, produit de cet opéron, peut

ainsi se lier à MexR, et inhiber la répression de l'expression de la pompe MexAB-OprM (Daigle & al, 2007).

D'autre part, le système régulateur ParRS a récemment été identifié comme étant impliqué dans la résistance à de nombreux antibiotiques. Ce système régule la transcription de l'opéron *arnBCADTEF* (impliqué dans la modification du LPS, § 3.2.4.3), l'expression de la pompe MexXY (indépendante de MexZ) et la répression de l'expression de la porine OprD. Des mutations de ce système de régulation confèrent à la fois la résistance aux polymyxines, aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones et aux β -lactamines (Muller & al, 2011).

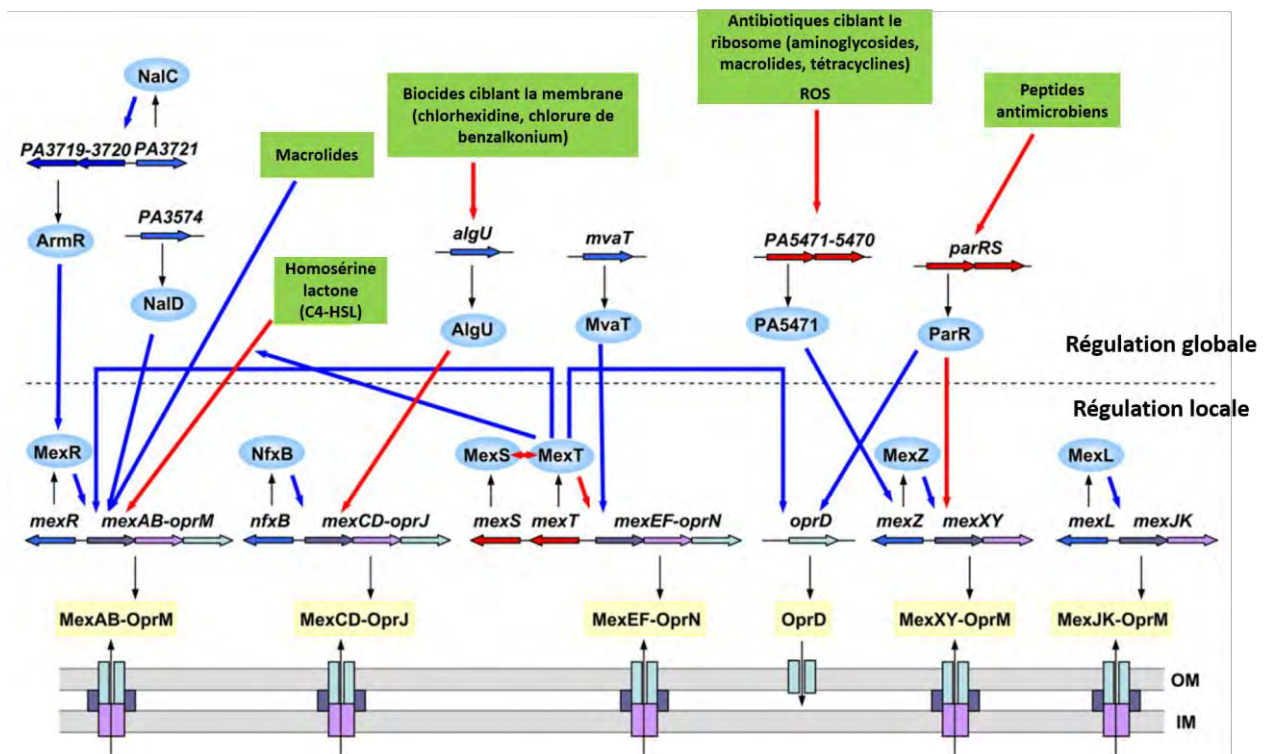


Figure 28 : Voies de régulation de l'expression des pompes à efflux et de la porine OprD chez *P. aeruginosa*. Les flèches bleues et rouges indiquent respectivement l'activation et la répression. Les régulateurs sont indiqués par les cercles bleus et les signaux environnementaux par les rectangles verts. (Adapté de Fernandez & Hancock, 2012, Clinical Microbiology Reviews).

3.2.4. Les autres systèmes de résistance

3.2.4.1. La protection de la synthèse protéique

Les macrolides tels que l'érythromycine et l'azithromycine, qui inhibent la synthèse protéique, sont couramment utilisés contre *P. aeruginosa*. La bactérie (notamment la souche PAO1) est cependant naturellement résistante aux macrolides *in vitro*, avec une CMI de 128 mg/L pour l'azithromycine et de 512 mg/L pour l'érythromycine en milieu Mueller-Hinton (MH) (Gillis & al, 2005 ; Morita & al, 2013). Néanmoins, en présence de concentrations sub-inhibitrices (inférieures à la CMI), l'azithromycine inhibe le quorum sensing et la formation de biofilms. Par contre, dans des souches de phénotype *nfxB*, cet antibiotique permet de sélectionner des mutants qui surexpriment la pompe MexCD-OprJ et la céphalosporinase AmpC et sont ainsi capables d'assurer la formation du biofilm. La présence de mutations dans l'ARN ribosomal 23S, qui empêche la fixation de l'azithromycine au ribosome, confère également une résistance à cet antibiotique (Morita & al, 2013). Ces systèmes de résistance n'affectent cependant pas vraiment l'action des macrolides, car il a été démontré que la surexpression de la pompe MexCD-OprJ entraîne la réduction de l'expression des pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM et l'augmentation de l'expression des porines, réduisant ainsi la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux macrolides, mais également aux aminoglycosides (Buyck & al, 2012).

Quant aux tétracyclines et au chloramphénicol, également inhibiteurs de la synthèse protéique (§ 1.2.2), *P. aeruginosa* leur est également naturellement résistante grâce aux pompes à efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM (Morita & al, 2001). Tout comme les fluoroquinolones (ciprofloxacine) ou les aminoglycosides (tobramycine), les tétracyclines induisent également la formation de biofilms (Linares & al, 2006).

3.2.4.2. La réparation et la protection de la synthèse des acides nucléiques

La ciprofloxacine fait partie des fluoroquinolones utilisées en routine dans les traitements anti-*Pseudomonas* (Poole, 2011). Ces antibiotiques inhibent la synthèse des

acides nucléiques en interagissant avec les enzymes de réplication notamment l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (§ 1.2.3). Bien que la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones passe principalement par les pompes à efflux (§ 3.2.3), elle passe également par des mutations des enzymes cibles. L'ADN gyrase (GyrA et GyrB) est la cible de prédilection des fluoroquinolones, elle est donc préférentiellement modifiée. On retrouve néanmoins quelques mutations de la topoisomérase IV (ParC et ParE) chez des isolats multirésistants (Hooper, 1993). La plupart des mutations sont localisées au niveau du domaine de fixation des quinolones (QRDR) et certaines souches multirésistantes présentent plusieurs mutations de l'ADN gyrase GyrA et/ou de la topoisomérase ParC, les mutations de GyrB et ParE étant plus rares (Poole, 2011).

Le biofilm contribue également à la résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones. En effet, en présence de concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine, la formation de biofilms augmente et la motilité des bactéries (« swarming ») diminue. (Linares & al, 2006). Le système de régulation *parR/parS* semble également impliqué dans la résistance aux fluoroquinolones, en contribuant à la réduction de l'influx (réduction de la perméabilité membranaire) et à l'augmentation de l'efflux (surexpression des pompes à efflux) (Muller & al, 2011).

La résistance aux quinolones implique également des systèmes de réplication et de réparation de l'ADN. Il a été montré que des mutants des hélicases RuvA et RecG ainsi que des recombinases XerD et SSS présentent une augmentation de la sensibilité à la ciprofloxacine (Olivares & al, 2013).

3.2.4.3. La modification du LPS

Contrairement aux bactéries des genres *Proteus*, *Serratia* et *Burkholderia*, *P. aeruginosa* n'est pas naturellement résistante aux polymyxines. Elle est cependant capable de développer une résistance à ces antibiotiques et cinq systèmes à deux composantes ont été décrits à ce jour comme étant impliqués dans cette résistance (Olaitan & al, 2014) : PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ, ParR/ParS, ColR/ColS et CprR/CprS (Fig. 29).

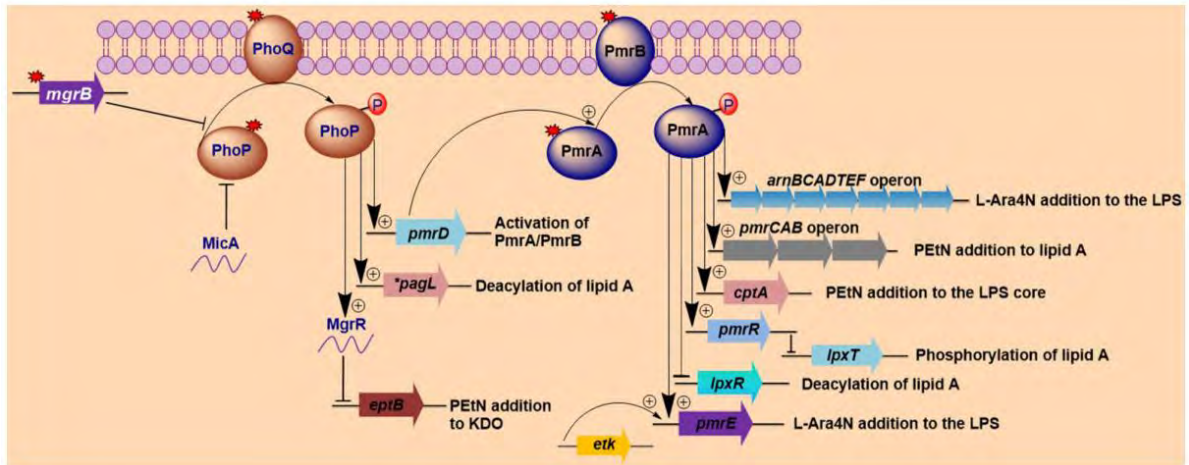


Figure 29 : Régulation des gènes modificateurs du LPS impliqués dans la résistance aux polymyxines. (Adapté d'Olaitan & al, 2014, Frontiers in Microbiology).

Les systèmes *pmrA/pmrB* et *phoP/phoQ* stimulent la modification du LPS par addition du groupement L-Ara4N (§ 2.2.2), sous le contrôle de l'opéron *arnBCADTEF*. La stimulation de ces systèmes de régulation est généralement induite par des mutations. Une seule mutation a été décrite chez PmrA comme étant responsable de la résistance, tandis que plusieurs mutants de PmrB ont été retrouvés chez des isolats cliniques résistants de *P. aeruginosa*. Les mutations sont localisées au niveau du domaine périplasmique et du domaine DHP (domaine de dimérisation et accepteur de groupement phosphate) de PmrB, les mutations les plus significatives étant localisées au niveau du motif histidine. La plupart des mutants *pmrA/pmrB* présentent une concentration minimale inhibitrice (CMI) comprise entre 4 et plus de 512 mg/L.

Contrairement à *Salmonella*, la résistance aux polymyxines causée par l'activation du système *phoP/phoQ* n'est pas dépendante du système *pmrA/pmrB* chez *P. aeruginosa*. L'activation du système résulte de mutations du gène *phoQ* conduisant à l'activation de l'opéron *arnBCADTEF*. Les mutations du gène *phoP* tendent plutôt à agir comme des suppresseurs chez les souches sensibles possédant des mutations des deux gènes. Les mutants *phoP/phoQ* présentent une CMI comprise entre 8 et plus de 512 mg/L.

Il a été récemment montré que les mutants possédant à la fois des mutations *pmrB* et *phoQ* sont beaucoup plus résistants aux polymyxines que les souches possédant l'une ou l'autre des mutations. Une réversion du phénotype de résistance est cependant possible, notamment par perte des mutations *pmrB* ou *phoQ* (réversion vers le phénotype sauvage), par addition d'une mutation supplémentaire à *phoP* ou par troncature du gène *phoQ* à cause de mutations secondaires.

Les systèmes ColR/ColS et CprR/CprS ont, quant à eux, été décrits comme étant impliqués dans la résistance aux polymyxines chez des mutants cliniques *phoQ*. Ces systèmes semblent interagir, grâce à des mutations, avec le système *phoP/phoQ*, en augmentant l'activité de PhoQ, contribuant ainsi à une augmentation de la résistance aux polymyxines. De plus, les systèmes *cprR/cprS* et *parR/parS* ont été décrits comme étant impliqués dans la résistance adaptative aux polymyxines. Les deux systèmes régulent l'expression de l'opéron *arnBCADTEF* et donc la modification du LPS. Il a été montré que des mutations de ParR ou de ParS entraînent une expression constitutive de l'opéron *arnBCADTEF* indépendante du système *pmrA/pmrB*, contribuant ainsi à la résistance aux polymyxines. Cette résistance semble cependant impliquer d'autres gènes régulés par le système *parR/parS* (Muller & al, 2011). Les mutants *parR/parS* présentent une CMI de 2 mg/L.

Les gènes impliqués dans la modification ou l'interaction avec le LPS semblent impliqués dans la résistance aux polymyxines. C'est le cas de la protéine de la membrane externe OprH qui est surexprimée dans un milieu déficient en ions Mg^{2+} ou chez des souches mutantes (à l'instar des souches *phoQ*-) et qui confère une résistance aux polymyxines en se liant au LPS, le rendant ainsi inaccessible aux polymyxines.

3.2.5. Evolution de la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

En plus des systèmes de résistance canoniques décrits précédemment, il a été récemment montré que *P. aeruginosa* est capable d'accumuler des mutations aléatoires conduisant ainsi à l'émergence de souches multirésistantes comportant des hypermutations. La plupart de ces mutations affectent des régulateurs transcriptionnels, les systèmes de

synthèse et de réparation de l'ADN, les gènes d'adaptation (biofilm, quorum sensing, etc.). Ces hypermutations ont été décrites en présence de β -lactamines, de fluoroquinolones et de carbapénèmes (Solé & al, 2015 ; Cabot & al, 2016) et les souches hypermutantes semblent être impliquées dans la prévalence des infections chroniques chez des patients atteints de mucoviscidose (Maciá & al, 2005) (**Fig. 30**).

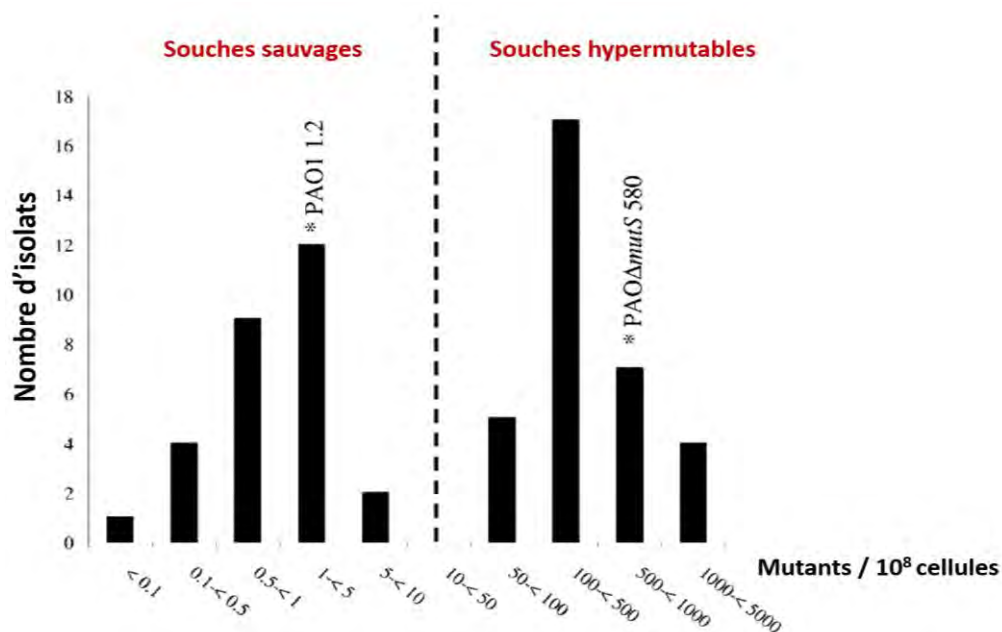


Figure 30 : Distribution de la fréquence des mutations chez 62 isolats cliniques retrouvés chez des patients atteints d'infections chroniques. Les fréquences de mutations de la souche contrôle PAO1 et de la souche hypermutable dérivée PAO Δ mutS sont indiquées. (Adapté de Maciá & al, 2005, Antimicrobial Agents Chemotherapy).

3.2.5.1. Evolution de la résistance aux β -lactamines

Chez les souches hypermutantes de *P. aeruginosa*, la résistance aux β -lactamines est causée par la surexpression de la céphalosporinase AmpC (§ 3.2.2.1), due à des mutations de gènes codant pour des enzymes de recyclage impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, notamment DacB (PLP4), AmpD et AmpR. Aucune de ces souches ne présente cependant de résistance liée à la surexpression de pompes à efflux.

D'autres hypermutants présentent des mutations du gène *galU* qui code pour une UDP-glucose pyrophosphorylase, l'une des enzymes requises pour la synthèse du LPS. Cette enzyme est inactivée chez ces mutants et confère une augmentation de la résistance à la ceftazidime et au méropénème. Ces mutants présentent également une mutation du régulateur GacS, facteur impliqué dans la virulence, la formation du biofilm et la résistance aux antibiotiques.

3.2.5.2. Evolution de la résistance aux fluoroquinolones

Les hypermutants résistants aux fluoroquinolones (ciprofloxacine) présentent plusieurs mutations des domaines QRDR de l'ADN gyrase GyrA et/ou de la topoisomérase ParC. Ces mutants surexpriment également certaines pompes à efflux, notamment la pompe MexEF-OprN ou la pompe MexAB-OprM (liée à une mutation du gène *mexR*).

Ces mutants présentent également une délétion de trois nucléotides du gène codant pour PmrB, un régulateur de la modification du LPS (§ 3.2.4.3). Cette mutation n'augmente pas la résistance à la colistine (polymyxine E) mais contribue à une résistance croisée aux fluoroquinolones. Certains mutants présentent également des mutations de gènes régulateurs (*gacR* et *retS*) ou encore de l'exonucléase RecJ.

3.2.5.3. Evolution de la résistance aux carbapénèmes

Les hypermutants résistants aux carbapénèmes présentent tous des mutations qui entraînent la répression de l'expression de la porine OprD. Ces mutants présentent également des mutations des gènes *mexR* et *nalC* liées à la surexpression de la pompe MexAB-OprM. Des mutations de MexT ont été identifiées chez des mutants résistants qui ne surexpriment cependant pas la pompe MexEF-OprN. Ces mutants présentent également des mutations du gène *pbpA* qui code pour la transpeptidase PLP2, enzyme majoritairement ciblée par les carbapénèmes. De larges délétions au sein du chromosome bactérien ont été retrouvées chez certains mutants (jusqu'à 300 000 nucléotides chez des mutants résistants au méropénème), entraînant ainsi l'absence de cibles des antibiotiques.

4. Les pompes à efflux de la famille RND : structure et mécanisme

4.1. Architecture

Les pompes d'efflux de la famille de transporteurs RND sont des systèmes tripartites constitués d'une protéine de la membrane externe (OMF), d'une protéine de fusion périplasmique (MFP) et d'un transporteur inséré dans la membrane interne (RND) (**Fig. 31**). Ces complexes traversent entièrement les deux membranes et l'espace périplasmique, permettant ainsi le transport des molécules, notamment des antibiotiques du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Chez *P. aeruginosa*, les douze gènes codant pour ces pompes sont organisés en opérons comportant pour la plupart deux gènes codant pour la protéine MFP et le transporteur RND. Sept d'entre eux portent également le gène codant pour une OMF, les autres en étant dépourvus (Lister & al, 2009) (**Fig. 32**).

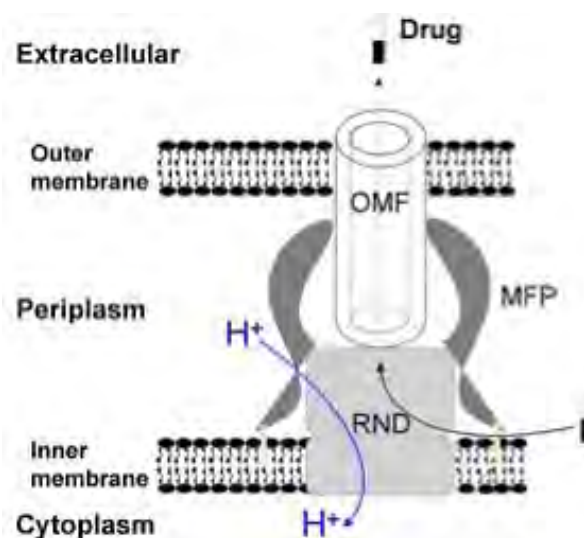


Figure 31 : Organisation des pompes à efflux tripartite de la famille RND.

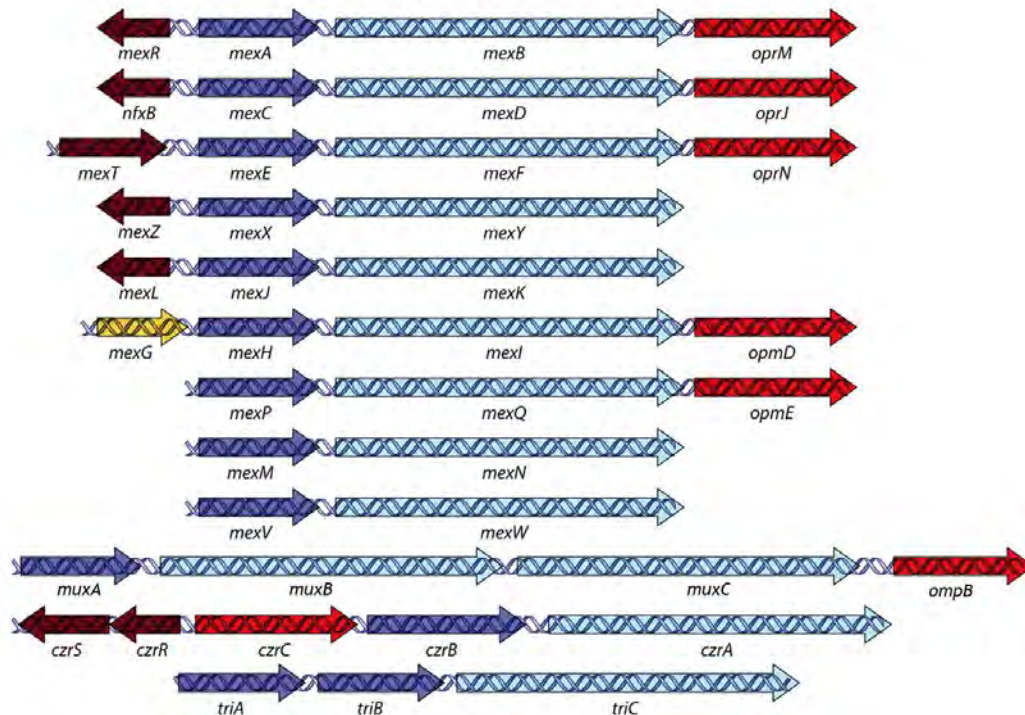


Figure 32 : Les opérons codant pour les pompes à efflux chez *P. aeruginosa*. Les flèches rouge sombre indiquent des gènes régulateurs, les gènes codant pour les protéines MFP (en violet), les transporteurs RND (en bleu) et les protéines OMF (en rouge) sont indiquées. La protéine MexG, en jaune, est de fonction inconnue, bien qu'il ait été suggéré qu'elle soit insérée dans la membrane interne afin de contribuer à la fonction de la pompe MexHI-OpmD. (Adapté de Lister & al, 2009, Clinical Microbiology Review).

4.1.1. Le transporteur RND

Plusieurs structures de transporteurs RND ont été résolues à ce jour, dont MexB de la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Sennhauser & al, 2009) et MtrD de *Neisseria gonorrhoeae* (Bolla & al, 2014) mais le mieux caractérisé est le transporteur AcrB de la pompe AcrAB-TolC d'*Escherichia coli* (Murakami & al, 2002 ; Yamaguchi & al, 2015). Ce transporteur possède un large spectre d'activité et contribue à la résistance à de nombreuses molécules (antibiotiques, détergents, colorants, solvants). AcrB constitue donc un modèle idéal pour l'étude du mécanisme d'efflux, avec environ 40 structures décrites à ce jour dans la PDB, la structure entière de plus haute résolution ayant été obtenue à 2,5 Å (Sennhauser & al, 2007).

4.1.1.1. Structure cristallographique du transporteur AcrB

AcrB est un homotrimère de 330 kDa. Chaque monomère, composé de 1049 résidus, présentant une duplication de séquence, est constitué de deux principaux domaines, un domaine transmembranaire d'environ 50 Å inséré dans la membrane interne et d'un domaine périplasmique d'environ 70 Å (**Fig. 33**).

Le domaine transmembranaire est constitué de 12 hélices α transmembranaires (TM) et d'une hélice α cytosolique ($l\alpha$) située entre les hélices TM6 et TM7. Les 12 hélices de chaque monomère entourent un pore central d'environ 30 Å de diamètre ouvert sur le cytoplasme. Il a été montré que ce pore, considéré au départ comme étant aqueux, est rempli de phospholipides (Nakashima & al, 2013). Ce domaine présente également une cavité transmembranaire localisée entre les hélices TM8 et TM9.

Le domaine périplasmique est constitué de deux sous-domaines, le domaine d'amarrage et le domaine du pore.

Le domaine d'amarrage est constitué de deux sous-domaines, les domaines DN et DC contenant chacun des structures « en épingle à cheveux β » (β -hairpin). Les structures « en épingle à cheveux β » de chaque monomère pénètrent au sein du monomère voisin, formant ainsi un entrelacement qui contribue à stabiliser le trimère. Le domaine d'amarrage de chacun des trois monomères forme au sein du trimère un entonnoir avec un diamètre interne d'environ 30 Å, équivalent aux dimensions de l'extrémité inférieure de TolC (Koronakis & al, 2000). Cet entonnoir correspond à la cavité centrale périplasmique.

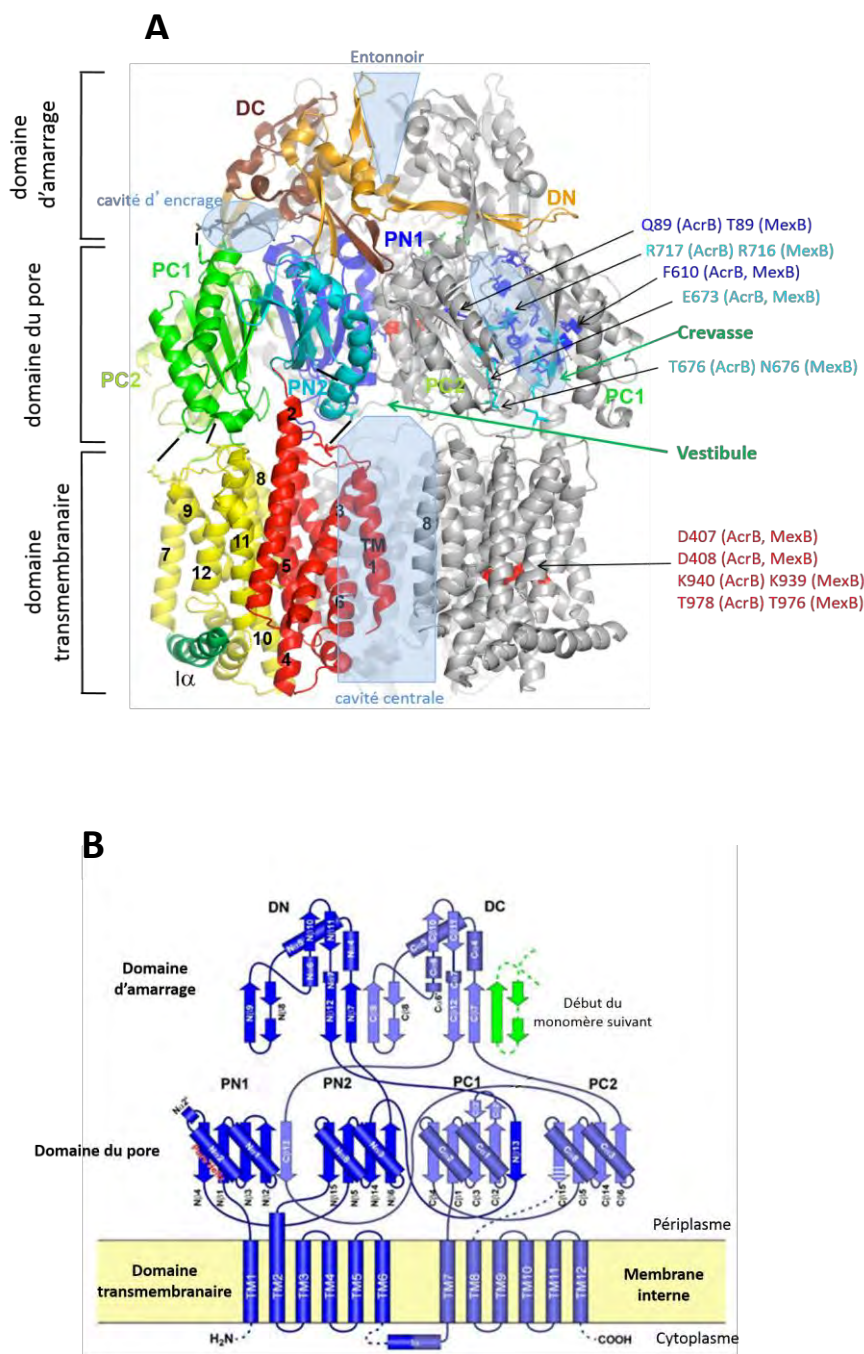


Figure 33 : Structure du trimère (A) et topologie d'un monomère (B) d'AcrB. L'un des monomères est colorié en fonction de ses domaines structuraux (A). Les résidus impliqués dans le transfert de protons chez AcrB et MexB sont indiqués en rouge. Les résidus indiqués en bleu correspondent aux résidus de la crevasse. Les différentes cavités sont matérialisées par les surfaces bleues transparentes. Code PDB : 1IWG (Adapté de Pagès & al, 2011, Revue Francophone des Laboratoires et de Yamaguchi & al, 2015, Frontiers in Microbiology).

Le domaine du pore est quant à lui constitué de 4 sous-domaines, les domaines PN1 et PN2 localisés au niveau de l'extrémité N-terminale entre les hélices TM1 et TM2 et les domaines PC1 et PC2 localisés au niveau de l'extrémité C-terminale entre les hélices TM7 et TM8. Les quatre domaines, constitués d'une répétition d'un motif β - α - β , forment deux poches, la crevasse, formée entre les domaines PC1 et PC2 de chaque monomère, et le vestibule, formé entre les domaines PN2 et PC2 de deux monomères voisins (**Fig. 34**).

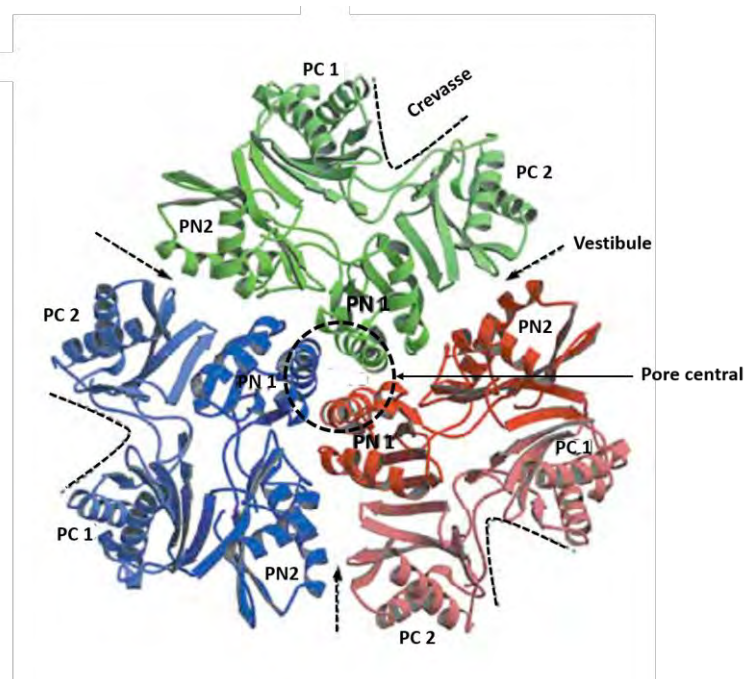


Figure 34 : Vue transversale du domaine du pore d'AcrB (vue de dessus, depuis le domaine d'amarrage). Les différentes poches formées par les sous-domaines (crevasse et vestibule) sont indiquées et les trois monomères indiqués en rouge, vert et bleu présentent la même conformation. (Adapté de Murakami & al, 2002, Nature).

La crevasse correspondrait au site d'interaction avec la protéine MFP et les deux poches ont été décrites comme étant les portes d'entrée des substrats (Murakami & al, 2002). Cette hypothèse a été réfutée pour le vestibule car aucune des structures d'AcrB résolues en complexe avec un ligand localisé au sein de la cavité centrale n'a permis

d'identifier une densité électronique correspondant à un ligand fixé au niveau du vestibule (Yu, 2003 ; Pos & al, 2004) (**Fig. 35**). De plus, la présence de l'hélice α centrale à l'extrémité distale du vestibule empêche la progression du substrat à travers cette poche (**Fig. 35**).

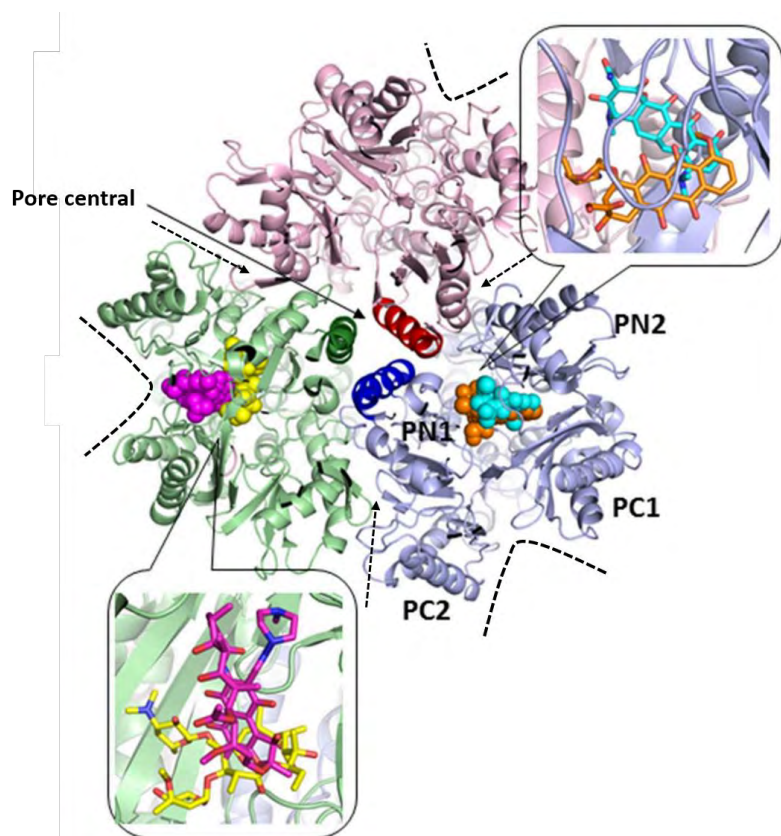


Figure 35 : Vue transversale du domaine du pore d'AcrB (depuis le domaine d'amarrage) en complexe avec différents antibiotiques. Les sites de fixation au niveau de la crevasse (indiquée par les courbes en pointillés), de la minocycline (en cyan), de la doxorubicine (en orange), de la rifampicine (en magenta) et de l'érythromycine (en jaune) sont indiqués. Les hélices de chaque monomère qui ferment l'extrémité du vestibule (indiqué par les flèches en pointillés) sont indiquées en vert, en rouge et en bleu. Les trois monomères représentés en vert clair, en bleu clair et en rose pâle présentent des conformations différentes. (Adapté de Yamaguchi & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

De récentes études de dynamique moléculaire et de mutagenèse dirigée semblent cependant suggérer que le vestibule est bien impliqué dans l'entrée des substrats, mais uniquement dans l'entrée de molécules de faible poids moléculaire (acriflavine), les

molécules de haut poids moléculaire (novobiocine) passant préférentiellement par la crevasse (Husain & al, 2011 ; Yao & al, 2013).

Ces poches forment des cavités dites « proximales » ouvertes sur le périplasma et des cavités dites « distales » ouvertes sur la cavité centrale (entonnoir) du domaine d'amarrage et sont reliées entre elles par une boucle (G-loop ou switch loop). La cavité proximale constitue la cavité d'accès des substrats, la cavité distale correspondant à la cavité de fixation des substrats (voir paragraphe suivant). La cavité proximale du vestibule communique avec la cavité transmembranaire comprise entre les hélices TM8 et TM9, permettant ainsi l'efflux des substrats depuis la membrane interne. Ces poches contiennent des résidus aromatiques, polaires et chargés qui sont favorables aux interactions avec les substrats et contribuent ainsi à la polyspécificité d'AcrB (Murakami & al, 2006 ; Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012).

4.1.1.2. Mécanisme d'efflux péristaltique

Le mécanisme d'efflux a été décrit grâce à des données expérimentales. Dans les premiers cristaux obtenus dans le groupe d'espace R32, l'axe de symétrie cristallographique d'ordre 3 traversait le trimère, imposant une structure identique des trois monomères. Ce n'est que lorsqu'une nouvelle structure d'AcrB en complexe avec des ligands (minocycline, doxorubicine), a été résolue dans le groupe d'espace C2 dans lequel le trimère n'est pas contraint, que des premières hypothèses fonctionnelles ont pu être émises (Murakami & al, 2006).

Trois voies d'entrée des substrats ont été proposées, l'une depuis la membrane interne via une cavité située entre les hélices transmembranaires TM8 et TM9, la seconde depuis le périplasma, via la crevasse (Pos, 2009 ; Nikaido, 2009) ou le vestibule (voir § 4.1.1.1, domaine du pore) (Fig. 36). La troisième entrée possible correspondrait au pore central (Nakashima & al, 2011). Des expériences de mutagenèse dirigée et de dynamique moléculaire ont permis de montrer que les deux premières voies (transmembranaire et périplasmique) sont respectivement impliquées dans l'efflux des composés hydrophobes et

hydrophiles (Husain & al, 2011 ; Nakashima & al, 2011 ; Yao & al, 2013). Des expériences de mutagénèse ont également permis de montrer que le pore central constitue une voie de passage possible pour les substrats depuis le cytoplasme vers le périplasma, avant leur prise en charge par le vestibule ou la crevasse (Ohene-Agyei, Lea, & Venter, 2012).

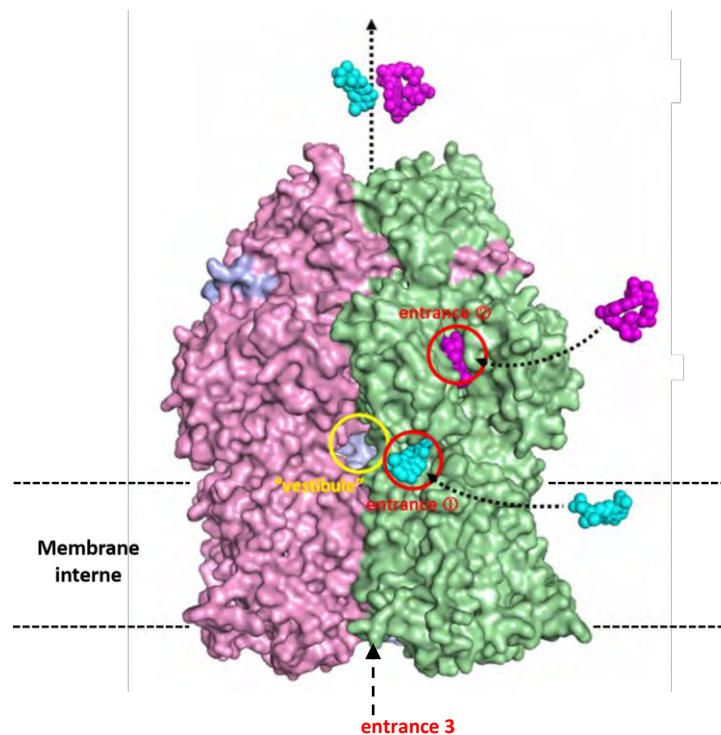


Figure 36 : Les différentes voies d'entrée possibles des substrats au sein du transporteur trimérique AcrB. Le vestibule (entouré en jaune), la crevasse (entrée 2) ainsi que la cavité transmembranaire située entre les hélices TM8 et TM9 (entrée 1) sont indiquées. L'entrée correspondant au pore central (entrée 3) est également indiquée (Adapté de Yamaguchi & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

Une éventuelle voie d'entrée supplémentaire a récemment été décrite. En effet, la mutation de deux résidus Ileu38 et Ileu671, situés sur des boucles localisées de part et d'autre du vestibule et reliant respectivement l'hélice transmembranaire TM1 au domaine PN1 et le domaine PC1 au domaine PC2 (**Fig. 37**) entraîne l'apparition de phénotypes sensibles aux antibiotiques. La localisation de ces résidus semble cependant en faveur d'une

contribution à la sélectivité du vestibule plutôt qu'une nouvelle voie d'entrée des substrats (Yao & al, 2013 ; Schuster, Vavra, & Kern, 2016).

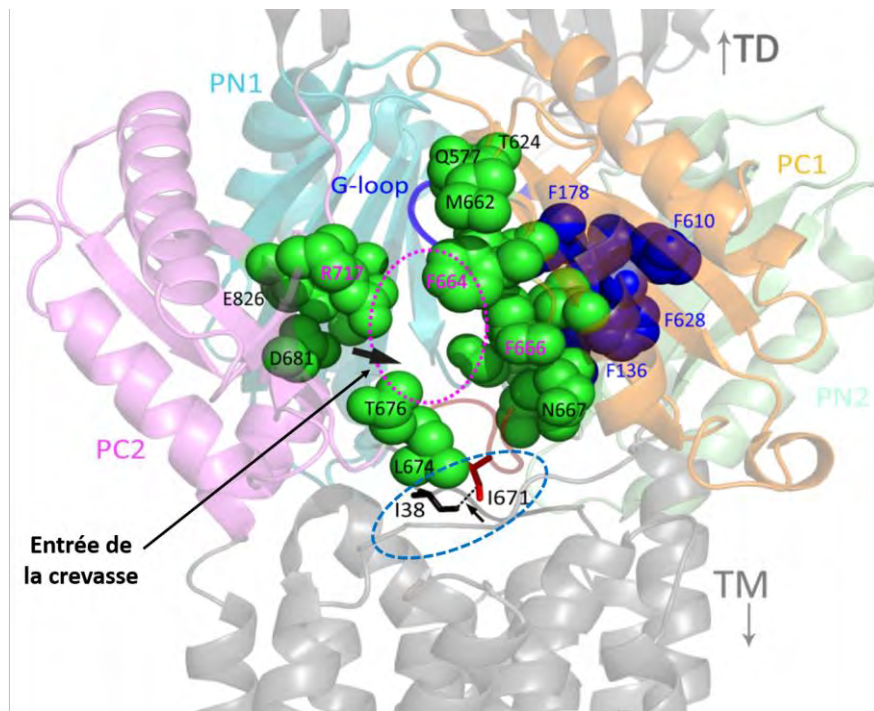


Figure 37 : Vue partielle de la crevasse de l'un des monomères d'AcrB. Les résidus de la cavité de fixation du substrat dite distale (en bleu) et de la cavité d'entrée du substrat dite proximale (en vert) sont indiqués. Le cercle mauve indique l'entrée de la crevasse. Les chaînes latérales des résidus I38 et I671, portés par des boucles qui délimitent la possible entrée supplémentaire sont indiqués. **TM** : domaine transmembranaire. **TD** : domaine d'amarrage. (Adapté de Schuster, Vavra, & Kern, 2016, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

Contrairement aux structures cristallographiques montrant plusieurs substrats liés au transporteur (Yu & al., 2003 ; 2005 ; Hung & al., 2013) , il a été décrit qu'une seule molécule à la fois peut être effluée par le trimère d'AcrB. AcrB perd sa forme symétrique au cours de l'efflux et les trois monomères adoptent trois conformations différentes nommées conformations « loose » (L), « tight » (T) et « open » (O) correspondant respectivement aux trois étapes de l'efflux : l'entrée du substrat (L), la fixation (T) et l'extrusion (O) (**Fig. 38**). La

forme symétrique d'AcrB correspond donc à la forme libre du transporteur dans laquelle tous les monomères adoptent la conformation L. L'efflux s'effectue suivant un mécanisme de rotation péristaltique caractérisé par l'alternance des conformations LTO. Nous parlerons uniquement de l'efflux à travers la crevasse, car il s'agit de la voie d'entrée la mieux caractérisée, aussi bien au niveau structural qu'*in vivo* avec notamment l'apport de données de cross-link.

Le monomère en conformation L (« access monomer ») présente une cavité proximale en conformation ouverte grâce à l'éloignement du domaine PC1 par rapport au domaine PC2, permettant l'entrée du substrat. Les molécules de haut poids moléculaire (rifampicine, érythromycine) se fixent au niveau cette cavité proximale (Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012). La cavité distale quant à elle, est resserrée grâce à l'interaction entre les domaines PN2/PC1 et PN1/PC2 (**Fig. 39**).

Le monomère en conformation T (« binding monomer ») présente une conformation similaire à celle de l'« access monomer ». La cavité proximale est cependant plus resserrée, notamment grâce au déplacement de la G-loop (**Fig. 39**) et des domaines PC2, PC1 et PN2, permettant ainsi la progression du substrat vers la cavité distale. La réduction du volume de la cavité proximale empêche le retour du substrat en sens inverse. La cavité distale est quant à elle beaucoup plus ouverte grâce à l'éloignement des domaines PN2/PC1 par rapport aux domaines PN1/PC2 (**Fig. 39**). Cette cavité contient une poche hydrophobe riche en phénylalanine qui correspond à la poche de fixation des substrats de faible poids moléculaire (doxorubicine, minocycline) (Murakami & al, 2006). Dans les deux cas (access monomer et binding monomer), le substrat ne peut pas être expulsé car l'extrémité de la cavité distale qui débouche sur l'entonnoir est fermée.

Le troisième monomère nommé « extrusion monomer » est en conformation O et présente une extrémité de la cavité distale ouverte. La cavité transmembranaire est fermée par l'élongation de l'extrémité N-terminale de l'hélice TM8, et la cavité proximale par le mouvement du domaine PC2 vers le domaine PC1. Le rétrécissement de la cavité distale grâce au déplacement des domaines PN2/PC1 vers les domaines PN1/PC2 et l'ouverture de l'entonnoir contribuent à l'expulsion du substrat.

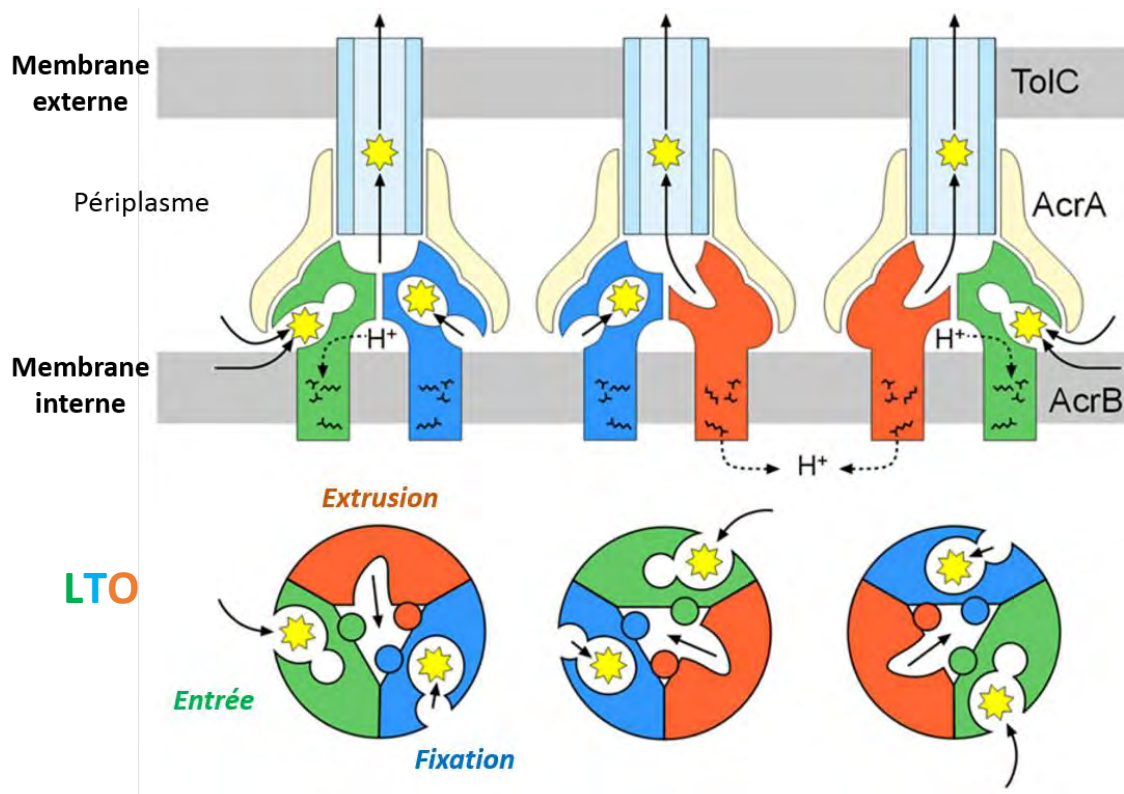


Figure 38 : Mécanisme d'efflux par rotation péristaltique à travers le complexe tripartite AcrAB-TolC. Le panneau supérieur montre une vue transversale du complexe et le panneau inférieur une vue transversale du domaine du pore du transporteur AcrB. Le substrat est représenté en jaune et les trois monomères d'AcrB, qui présentent différentes conformations (LTO), sont représentés en vert pour l'« access » monomère en conformation L (Loose), qui permet l'entrée du substrat, en bleu pour le « binding » monomère en conformation T (Tight), qui permet la fixation du substrat et en rouge pour l'« extrusion » monomère en conformation O (Open), qui permet l'expulsion du substrat. (Adapté de Yamaguchi & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

Ces changements conformationnels sont interdépendants, la conformation d'un monomère affectant celle du monomère voisin. Des expériences de cross-link et de mutagenèse ont permis de confirmer qu'il est impossible qu'un monomère puisse fonctionner de façon indépendante. Takatsuka et Nikaido (Takatsuka & Nikaido, 2009) ont en effet montré que la présence d'un monomère covalentement lié aux deux autres inactivé au niveau du réseau de transfert de protons (présenté dans le paragraphe suivant), inactive le trimère. Les trois monomères permettent ainsi le transport des substrats de façon séquentiellement et concertée. De récentes études de dynamique moléculaire réalisées à

partir de la structure d'AcrB en complexe avec la doxorubicine ont par ailleurs permis de montrer que la fixation d'un second substrat accélère les changements conformationnels permettant la dissociation et l'expulsion du premier substrat (Wang & al, 2015).

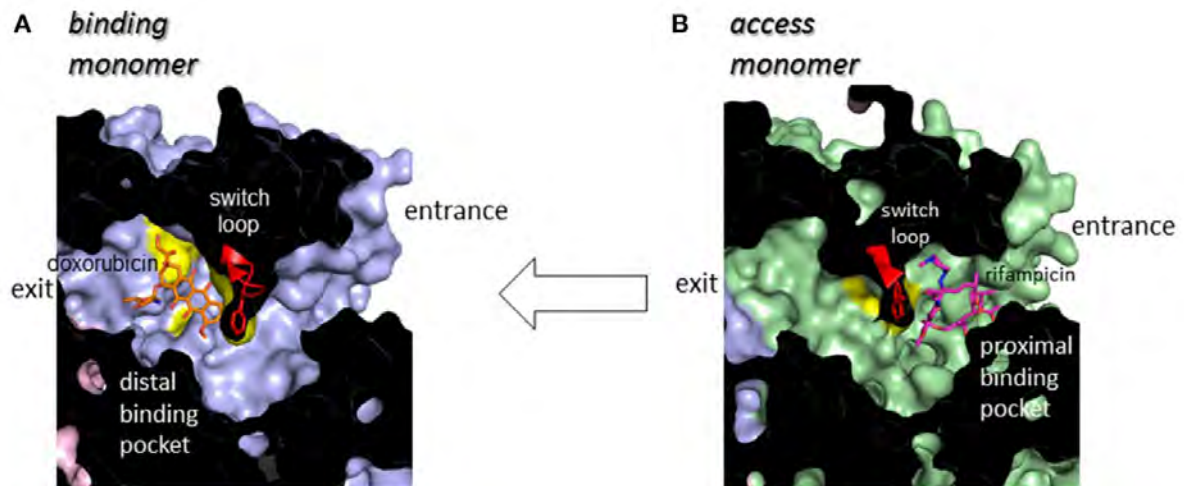


Figure 39 : Les différentes conformations adoptées par les monomères d'AcrB au cours de l'efflux. Le « binding » monomère (A), qui permet la fixation du substrat, présente une cavité distale plus ouverte et une cavité proximale plus resserrée que celles de l'« access » monomère (B) qui permet l'entrée du substrat. Cette différence de conformation est en partie liée au mouvement de la boucle (G-loop ou Switch loop) qui sépare les deux cavités, en présence d'un substrat. (Adapté de Yamaguchi & al, 2015, Frontiers in Microbiology).

4.1.1.3. L'énergie couplée à l'efflux

L'efflux de composés par les transporteurs de la famille RND est couplé à un gradient de protons à travers la membrane appelé force protomotrice (PMF). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que 5 résidus essentiels sont impliqués dans le transfert de protons au cours de l'efflux : Asp407, Asp408, Lys940 (Lys939 chez MexB), Arg971 et Thr978 (Arg969 et Thr976 chez MexB) (Eicher & al, 2014). Ces résidus, pour la plupart localisés au centre des hélices transmembranaires TM4 (Asp407, Asp408), TM10 (Lys940) et TM11 (Thr978) et à proximité de la surface cytoplasmique (Arg971), forment un réseau de liaisons hydrogène et de ponts salins (Fig. 40).

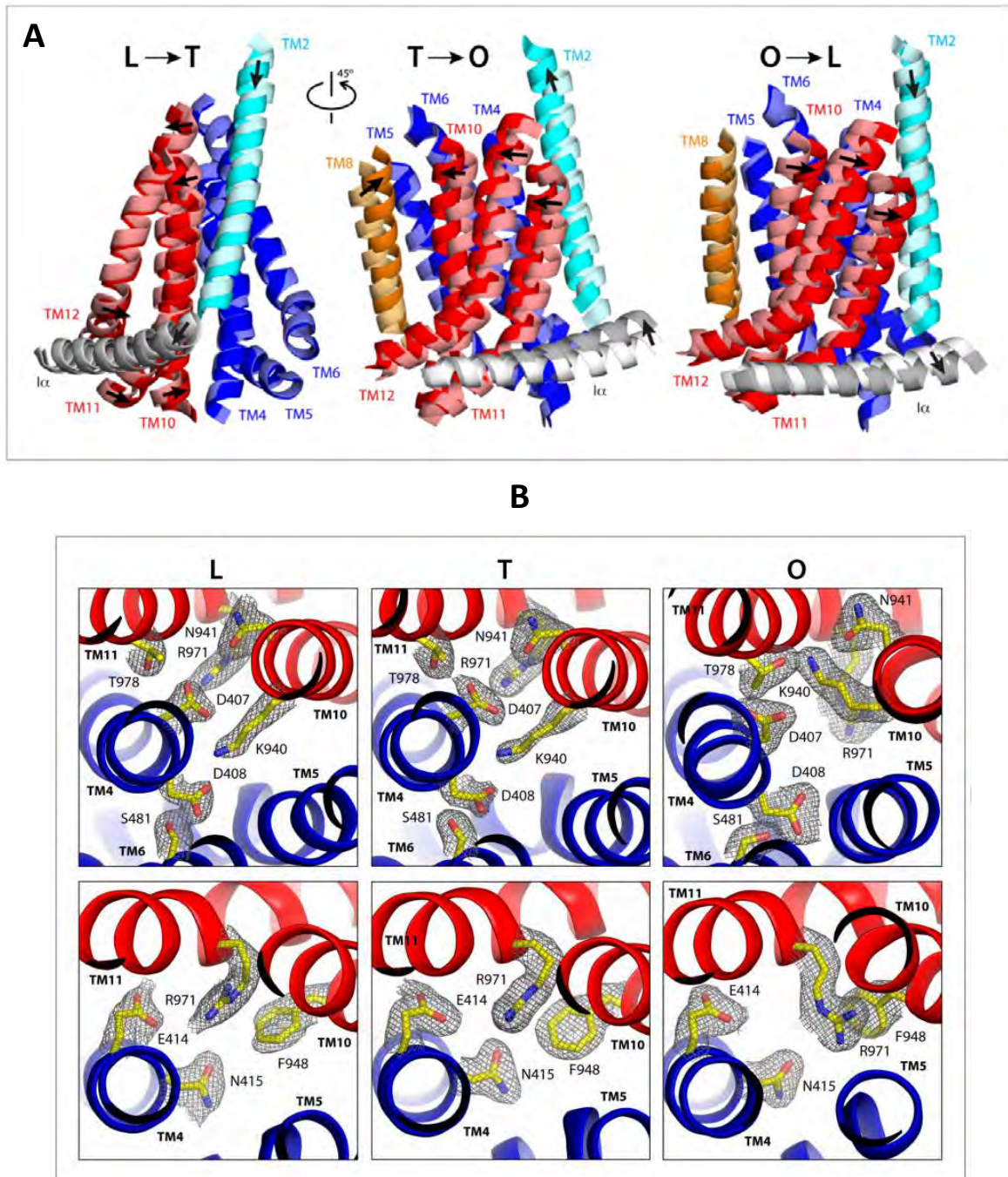


Figure 40 : Changements conformationnels impliqués dans le transfert de protons au cours de l'efflux vu depuis le domaine transmembranaire (A) ou depuis le périplasma (B). (A) Les états initiaux et finaux correspondant aux différentes conformations sont matérialisés respectivement par les couleurs claires et les couleurs sombres. (B) Les résidus impliqués dans le réseau de transfert transmembranaire de protons sont indiqués en jaune et représentés au sein des trois conformations L, T et O. Les résidus sont situés à l'interface entre deux motifs transmembranaires répétés (en bleu et en rouge). Le panneau supérieur (B) montre l'environnement des résidus D407 et D408 et le panneau inférieur (B) montre l'environnement du résidu R971. (Adapté de Eicher & al, 2014, eLife).

Le passage d'une conformation à l'autre ($L \rightarrow T$, $T \rightarrow O$ et $O \rightarrow L$) nécessite le mouvement des hélices transmembranaires TM2 et TM8, respectivement liées aux domaines PN2/PC1 et PN1/PC2. La fixation du substrat aux domaines PN2/PC1 provoque le mouvement de l'hélice TM2, initiant ainsi la transition $T \rightarrow O$. Ce mouvement de l'hélice entraîne une réorientation des résidus impliqués dans le transfert de protons, et notamment celle de la Lys940. Ce résidu permet le transfert d'un proton grâce à une chaîne de molécules d'eau liée au périplasma, conduisant ainsi à la protonation des résidus Asp407 et Asp408 au niveau de la surface périplasmique de la membrane interne. La protonation a donc lieu au cours du passage $T \rightarrow O$ (extrusion) et le transfert de protons du résidu Asp408 au résidu Arg971 a lieu au cours de la transition $O \rightarrow L$. La déprotonation, due au relargage des protons par le résidu Arg971 au niveau du cytoplasme, a également lieu au cours du passage $O \rightarrow L$, et permet de reconstituer le réseau de liaisons hydrogène et de ponts salins (**Fig. 40**).

4.1.2. Le canal de la membrane externe (OMF)

4.1.2.1. Aspects structuraux

Les OMFs sont impliquées dans l'étape finale de l'efflux des substrats exportés par le transporteur RND. Le canal TolC, de la pompe AcrAB-TolC d'*Escherichia coli* est la première OMF dont la structure a été résolue. C'est la protéine OMF la mieux caractérisée. La première information structurale, montrant la formation trimérique de la protéine et la présence peu classique de la longue extension périplasmique, a été obtenue par coloration négative en microscopie électronique à une résolution de 12 Å (Koronakis & al, 1997). La structure cristallographique a été résolue trois ans plus tard à 2,1 Å (Koronakis & al, 2000).

TolC est une protéine constituée de 471 résidus dont les monomères s'assemblent en homotrimère. Cet homotrimère d'environ 150 kDa forme un canal long de 140 Å organisé en deux principaux domaines : un domaine transmembranaire constitué de 12 brins β organisés en tonneau β d'environ 40 Å inséré dans la membrane externe, et un domaine périplasmique long d'environ 100 Å (**Fig. 41**). Ce second domaine est constitué de 12 hélices

α organisées en trois sous-domaines : le domaine α , le domaine équatorial et le domaine coiled-coil. Chaque monomère est formé par la répétition d'un motif conservé constitué de deux brins β transmembranaires (Fig. 41, S1-S2), d'une longue hélice (H3) et de deux hélices alignées le long de leur axe (H2 et H4), possédant chacune une de leur extrémité au niveau du domaine équatorial, formant ainsi une pseudo-hélice de même longueur que l'hélice H3. Ces pseudo-hélices confèrent une certaine flexibilité au trimère. Le domaine équatorial (ou domaine mixte α/β) est constitué d'un mélange de structures secondaires (hélices α et brins β).

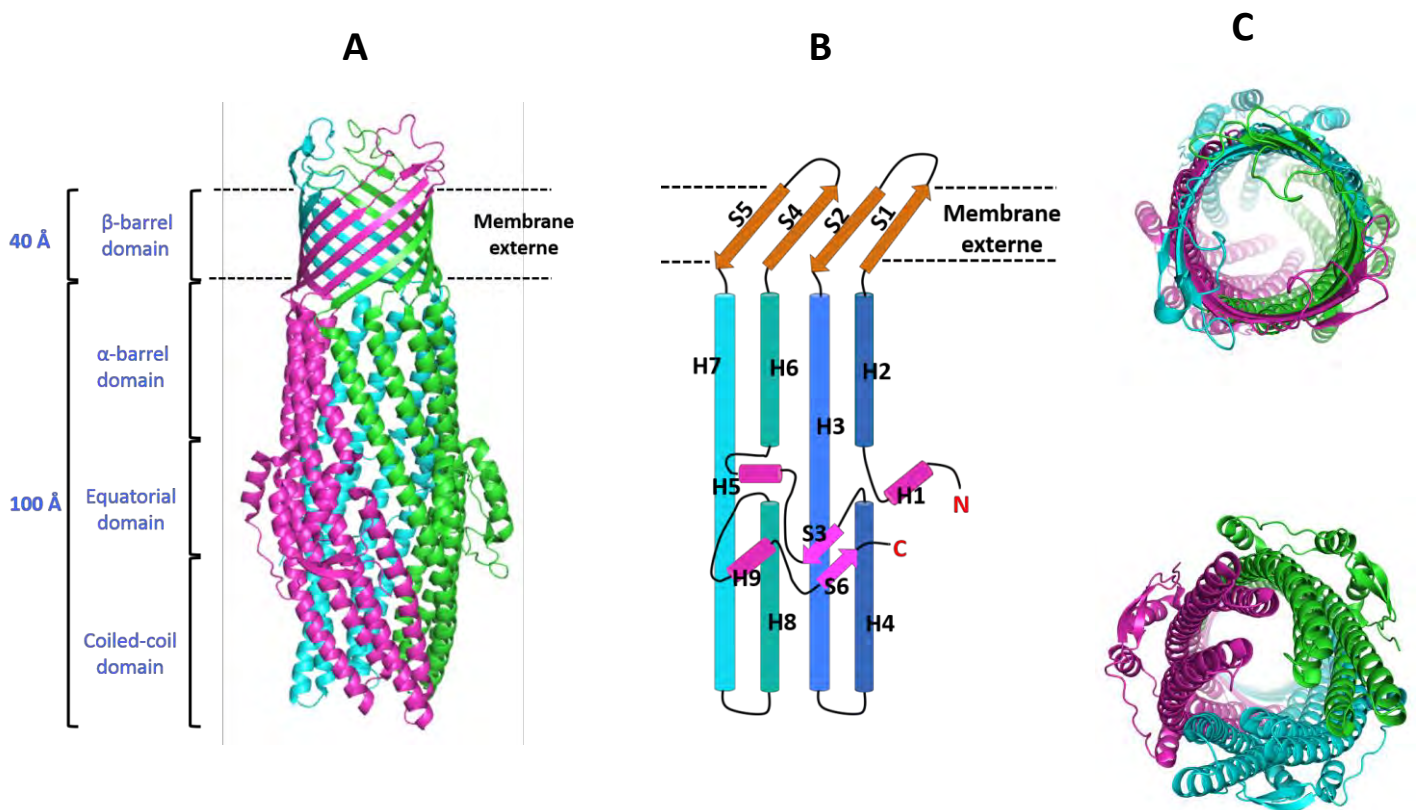


Figure 41 : Structure du trimère (A) et topologie d'un monomère (B) de TolC. Les extrémités extracellulaire (C, panneau supérieur) en conformation ouverte et périplasmique (C, panneau inférieur), légèrement ouverte sont également représentés. Les trois monomères sont représentés en magenta, vert et cyan (A). Code PDB 1EK9.

Contrairement au domaine transmembranaire au sein duquel les brins β forment un canal d'environ 35 Å de diamètre, l'extrémité périplasmique (ou domaine coiled-coil) est totalement fermée. Cette obstruction, qui résulte de l'incurvation des hélices α d'environ 20° par rapport à l'axe du canal, est due à la présence de ponts salins et de liaisons hydrogène intra- et intermonomériques entre des résidus localisés à l'extrémité des hélices périplasmiques. Une constriction supplémentaire, localisée plus haut dans le canal, est constituée par un anneau anionique formé par les groupements carboxylate des chaînes latérales des résidus Aspartate présents dans cette région (**Fig. 42**). Cet anneau constitue un filtre sélectif pour les cations. Ces deux verrous ne permettent donc pas l'efflux de molécules. Une ouverture du canal est donc nécessaire au cours du processus de translocation.

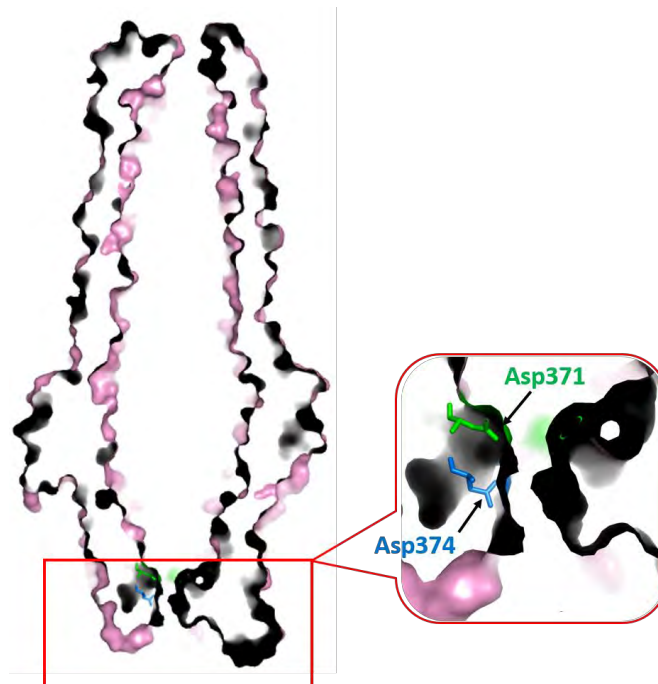


Figure 42 : Anneau anionique de TolC. Les résidus acides (Asp371 et Asp374) des trois monomères forment un anneau anionique qui constitue un filtre de sélectivité pour les cations.

Il existe de nombreux homologues structuraux de TolC chez *P. aeruginosa* (OprM, OprN, OprJ, OpmH, OpmG, voir **Tableau 1**) ainsi que chez la plupart des bactéries. Plusieurs d'entre eux ont également été cristallisés, notamment OprM de *P. aeruginosa*, MtrE de *Neisseria gonorrhoeae*, VceC de *Vibrio cholerae*, CmeC de *Campylobacter jejuni* et CusC d'*E. coli* (Akama & al, 2004 ; Phan & al, 2010 ; Monlezun & al, 2015 ; Lei & al, 2014 ; Federici & al, 2005 ; Kulathila & al, 2011 ; Lei & al, 2014 ; Su & al, 2014). Toutes ces OMF présentent la même architecture, exception faite du domaine équatorial qui montre des variations significatives, notamment au niveau de l'extrémité C-terminale. L'importance de ce domaine a été montrée grâce à des mutants de perte de fonction de TolC (Yamanaka & al, 2002 ; Bokma & al, 2006 ; Krishnamoorthy & al, 2013) et il semble être impliqué dans l'interaction avec le partenaire MFP. Par rapport à ses homologues, TolC est la seule à posséder un feuillet β supplémentaire au niveau de ce domaine.

4.1.2.2. Mécanisme d'ouverture

La plupart des structures de protéines OMF ont été résolues en conformation fermée (OprM, TolC, CusC) à l'une des extrémités ou au niveau des deux extrémités. Des structures de mutants artificiellement ouverts de TolC ont permis d'identifier des résidus clés qui contribuent à la fermeture de l'extrémité périplasmique et qui sont impliqués dans des liaisons hydrogène, comme décrit précédemment: Thr152, Asp153, Tyr362, et Arg367. La suppression des liaisons hydrogène et des ponts salins entre ces résidus entraîne une réorientation des hélices internes (H4 et H8) et des hélices externes (H3, H7) du trimère liée au relâchement de la contrainte de torsion et un élargissement du pore périplasmique (Andersen & al, 2002 ; Bavro & al, 2008 ; Pei & al, 2011). La caractérisation structurale de ces mutants a donc permis de décrire un mécanisme d'ouverture séquentiel impliquant une torsion des hélices, couplée à une dilatation du pore (**Fig. 43**). Les résidus impliqués dans cette ouverture varient d'une OMF à l'autre, mais le mécanisme semble être conservé. En effet, l'analyse par modes normaux d'OprM a permis de décrire un mécanisme d'ouverture similaire (Phan & al, 2010) et la réorientation des hélices conduisant à cette ouverture est

également observée pour le canal MtrE, de la pompe MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae*, dont la structure a été résolue en conformation ouverte (Lei & al, 2014)..

Cette ouverture semble par ailleurs médiée par l'interaction avec les partenaires au cours de l'assemblage (qui sera décrit au paragraphe 4.2).

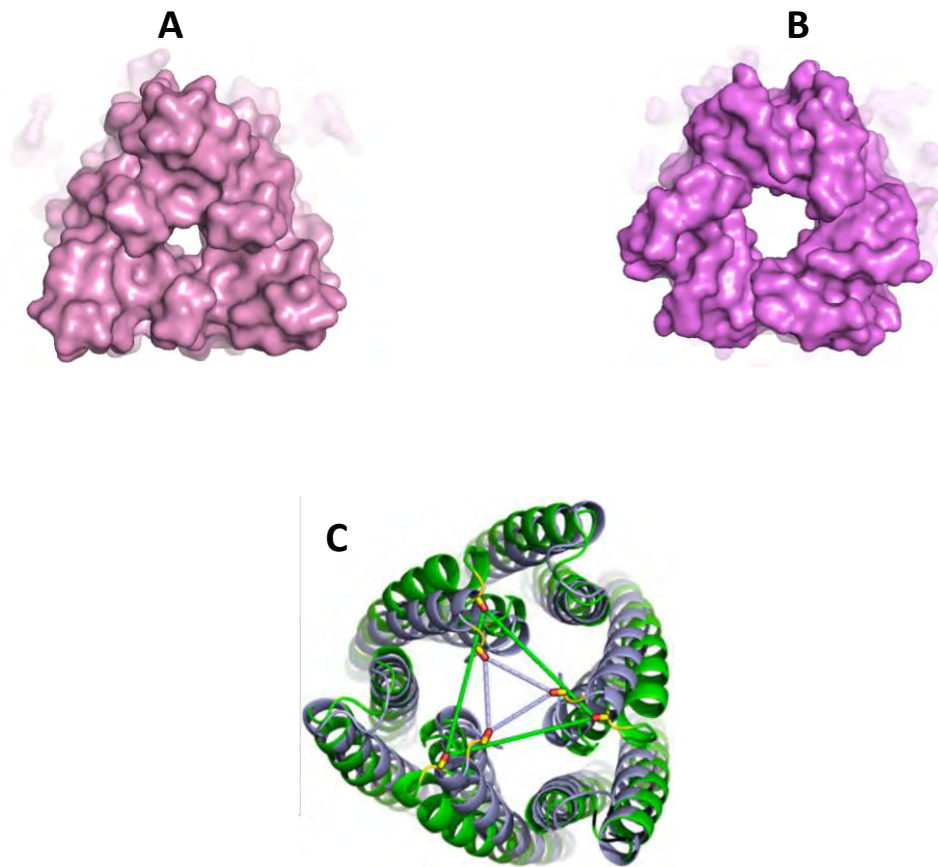


Figure 43 : Comparaison des extrémités périplasmiques de TolC (A) et de MtrE (B). MtrE présente une extrémité périplasmique en conformation ouverte contrairement à TolC. La superposition de la structure de TolC en conformation fermée (C, en violet) à la structure de TolC en conformation ouverte (C, en vert) montre les changements conformationnels de l'un des résidus (Gly365) impliqués dans l'ouverture du canal. (Adapté de Pei & al, 2011, PNAS). Code PDB : 1EK9 et 2XMN (TolC) et 4MT0 (MtrE).

4.1.2.3. Acylation des protéines OMF

La plupart des OMFs sont des lipoprotéines possédant une chaîne lipidique sur leur extrémité N-terminale. De manière générale, les lipoprotéines sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseur qui va traverser la membrane interne grâce à des systèmes de translocation de type Tat et Sec (Delisa & al, 2003 ; Papanikou & al, 2007). Le clivage du peptide signal est suivi par une modification de l'acide aminé N-terminal par addition d'un lipide allant s'insérer au niveau de la surface périplasmique de la membrane (Sankaran & Wu, 1994). Les modes d'acylation les plus courants sont la myristoylation (addition d'un myristate au niveau de la glycine N-terminale) et la palmitoylation (addition d'un palmitate au niveau de la cystéine N-terminale) (Resh, 1999). Même s'il a été montré que des protéines bactériennes peuvent subir une myristoylation après sécrétion à l'intérieur des cellules de l'hôte, la myristoylation reste un processus purement eucaryote, les bactéries et les virus (hormis deux entomopoxvirus) étant dépourvus de myristoyltransférases (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004).

Les lipoprotéines matures sont ensuite, soit adressées à la membrane externe grâce au système de translocation Lol, soit maintenues insérées dans la membrane interne. Il a été montré que la nature du résidu situé à proximité de la cystéine N-terminale, soit le résidu en position 2 chez *E. coli* ou en position 3 et 4 chez *P. aeruginosa*, conditionne l'adressage à la membrane externe ou le maintien au sein de la membrane interne. OprM possède une leucine et une isoleucine, en position 3 et 4, ce qui contribue à son adressage à la membrane externe tandis que la présence d'une lysine et d'une sérine à la place de ces résidus chez MexA conditionne son maintien dans la membrane interne (Terada & al, 2001 ; Narita & Tokuda, 2007).

Le système Lol est suffisant pour la translocation des lipoprotéines classiques. Cependant, les lipoprotéines possédant des feuilletts β transmembranaires sont adressées à la membrane externe sous forme dépliée et nécessitent des systèmes supplémentaires pour leur translocation et leur repliement. En effet, le système Lol interagit uniquement avec l'extrémité N-terminale acylée. Des protéines chaperonnes protègent donc les lipoprotéines non repliées de la dégradation et catalysent la translocation vers la membrane externe (Solov'eva & al, 2012). Un troisième système, la machinerie d'assemblage des protéines

membranaires organisées en feuilletts β transmembranaires (BAM), intervient dans l'assemblage des protéines au sein de la membrane externe (Knowles & al, 2009 ; Hagan & al, 2011). La **Figure 44** résume l'ensemble de ces systèmes de modification et de transport des OMF.

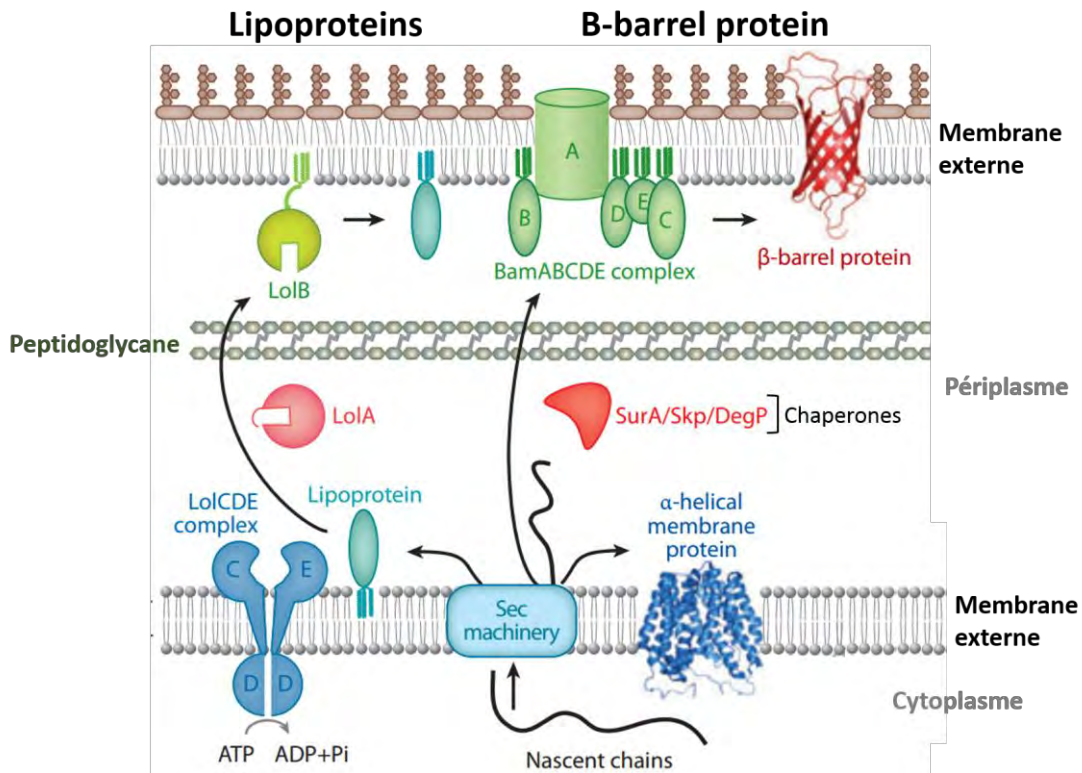


Figure 44 : Systèmes de sécrétion, de translocation et de repliement impliqués dans l'adressage des protéines à la membrane externe. Les protéines sont sécrétées à travers la membrane interne grâce au système Sec. Elles sont ensuite adressées à la membrane externe grâce au système de translocation Lol (protéines acylées) ou à des chaperonnes (protéines non acylées). Les protéines (acylées ou non) organisées en feuillet β sont prises en charge par le système d'assemblage transmembranaire BAM. (Adapté de Okuda & Tokuda, 2011, Annual Reviews of Microbiology).

Comme décrit précédemment, les lipoprotéines sont synthétisées sous forme de précurseurs dans le cytoplasme. Ces précurseurs possèdent un peptide signal qui permet l'adressage à la membrane interne. Ce peptide signal comporte une séquence consensus

(Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys) appelée « lipobox » située en amont de la cystéine N-terminale. La lipobox constitue le motif de reconnaissance de certaines des enzymes impliquées dans l'acylation des lipoprotéines qui se fait en trois étapes. Ces trois étapes impliquent trois enzymes conservées chez les bactéries Gram négatif : une diacylglyceryltransférase (Lgt), une signal peptidase de type II (LspA) et une transacylase (Lnt) (Okuda & Tokuda, 2011) (**Fig. 45**). Ces enzymes sont essentielles à la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella enterica*. et elles catalysent respectivement le transfert du groupement diacylglyceryl (DAG) du phosphatidylglycérol (PG) au groupement thiol de la cystéine de la lipobox (Lgt), le clivage du peptide signal en amont de la cystéine modifiée (LspA) et le transfert d'un glycérophospholipide à l'amine libre de la cystéine N-terminale des prolipoprotéines (Lnt), produisant ainsi des protéines matures triacylées.

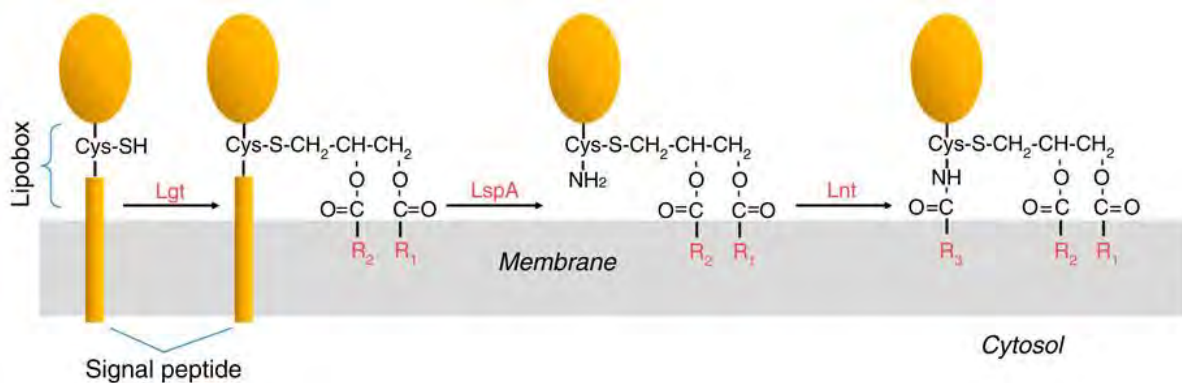


Figure 45 : Les trois étapes de l'acylation des lipoprotéines. (Mao & al, 2016, Nature Communication).

La triacylation semble être spécifique des bactéries Gram négatif. Des homologues de Lnt semblent cependant être présents chez des bactéries du genre *Mycobacterium* ainsi que chez des bactéries Gram positif dont le génome est riche en GC (*Corynebacter*, *Nocardia*, *Streptomyces*) (Tschumi & al, 2009). On ne retrouve aucun homologue de Lnt chez les bactéries Gram positif dont le génome est pauvre en GC, même si la lipoprotéine SitC,

triacylée grâce à une enzyme inconnue, a été retrouvée chez *Staphylococcus aureus* (Okuda & Tokuda, 2011). Lnt a tout d'abord été décrite comme étant essentielle au bon adressage des lipoprotéines à la membrane externe via le système de translocation Lol (Fukuda & al, 2002 ; Robichon & al, 2005). Des arguments (qui feront l'objet d'une discussion ultérieure) tendent cependant à montrer que la translocation médiée par le système Lol est indépendante de la triacylation.

4.1.3. L'adaptateur périplasmique MFP

4.1.3.1. Architecture générale

La protéine MFP est le troisième partenaire de la pompe à efflux et le dernier composant à avoir été caractérisé au niveau structural. Cette protéine a tout d'abord été décrite comme une protéine de fusion qui interagirait avec les deux membranes d'où le nom MFP. La protéine MFP est impliquée dans la stimulation de l'activité d'efflux du transporteur et dans le recrutement et l'ouverture de la protéine OMF afin de permettre l'efflux hors de la cellule (Zgurskaya & al, 2009 ; Symmons & al, 2015). Son implication dans la stabilisation des interactions au sein de la pompe sera décrite au paragraphe **4.2.1**.

Les MFPs sont des protéines qui adoptent une conformation linéaire et elles s'étendent de la surface de la membrane interne où elles interagissent avec le transporteur localisé dans la membrane interne, vers le périplasma où elles interagissent avec la protéine OMF. Cette structure linéaire s'organise, dans la plupart des bactéries, en quatre domaines : le domaine membrane proximal (MP), le domaine β , le domaine lipoyl et le domaine α (**Fig. 46**). La moitié N-terminale et la moitié C-terminale de la MFP se replient l'une sur l'autre comme une fermeture éclair pour former l'ensemble des quatre domaines. La taille de ces domaines est variable, afin de s'adapter à différents transporteurs tels que ceux des familles RND (AcrB et CusA d'*E. coli*, MexB, MexY, MexF et MexD de *P. aeruginosa*), ABC (MacB d'*E. coli*) et MFS (EmrB d'*Aquifex aeolicus*).

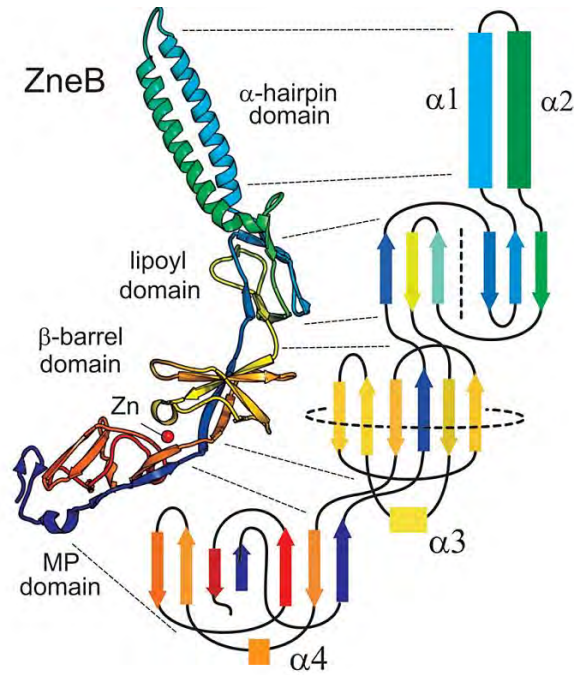


Figure 46 : Structure et topologie d'une MFP entière. Les quatre domaines de l'adaptateur ZneB sont représentés avec l'extrémité N-terminale en rouge et l'extrémité C-terminale en violet. Les deux moitiés N- et C-terminales se replient le long de la protéine pour former l'ensemble des domaines. (Adapté de Symmons & al., 2015, *Frontiers in Microbiology*). Code PDB : 3LNN.

Les premières structures de MFP notamment MexA de la pompe MexAB-OprM (Higgins & al, 2004 ; Akama & al, 2004) étaient toutes dépourvues du domaine MP. En conséquence, une construction raccourcie de ce domaine avait été réalisée pour résoudre la structure de AcrA de la pompe AcrAB-TolC (Mikolosko & al, 2006). La faiblesse de la densité électronique correspondant à ce domaine chez MexA montre la grande flexibilité de la protéine. Néanmoins, treize molécules de MexA, correspondant à deux fers à cheval en position « tête bêche » de six et sept molécules respectivement, étant présentes dans l'unité asymétrique, un ré-affinement de la structure en minimisant les contraintes de symétrie non cristallographique a finalement permis de reconstruire ce domaine pour neuf des treize molécules de l'unité asymétrique (Symmons & al, 2009) (**Fig. 47**).

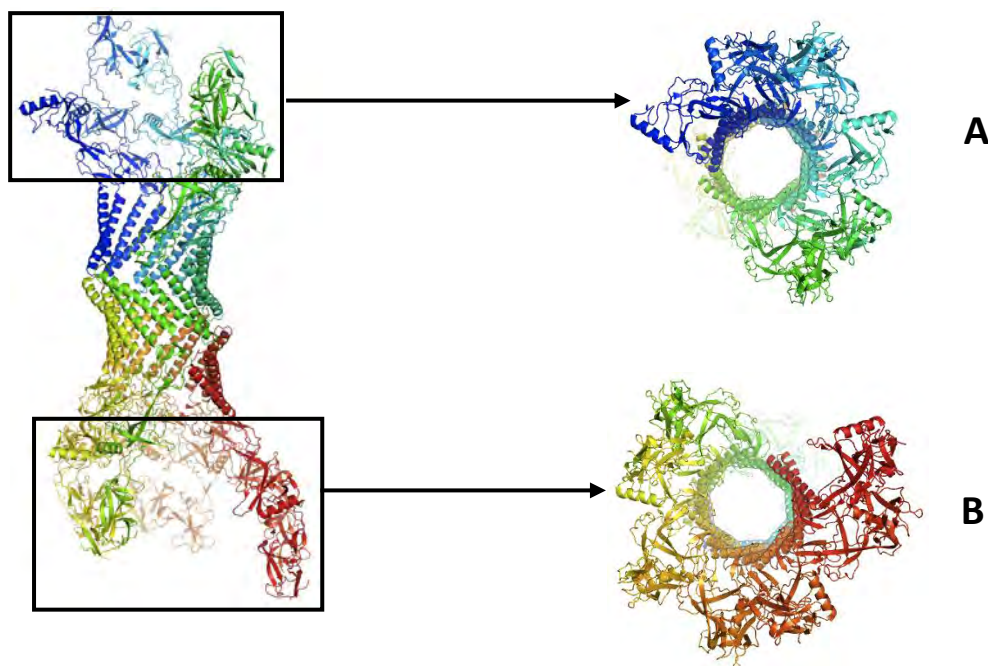


Figure 47 : Empilement cristallin de MexA. L'unité asymétrique contient un hexamère (A) et un heptamère (B) qui interagissent via leur domaine α . Chacune des structures est constituée de paires de dimères et l'ensemble forme un canal d'environ 40 Å de diamètre au sein duquel peuvent s'insérer l'OMF et le transporteur RND. Code PDB : 2V4D.

D'autres structures de MFP ont été résolues par la suite : MacA chez *E. coli* et chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Yum & al, 2009 ; Xu & al, 2012) suivie de MFPs associées à des pompes d'efflux spécifiques des métaux, notamment CusB d'*E. coli* seule ou en complexe avec le transporteur RND CusA (Su & al, 2009, 2011, 2012) ou encore ZneB de *Cupriavidus metallidurans* (De Angelis & al, 2010). La structure partielle d'AcrA de *Campylobacter jejuni* sous forme glycosylée a également été résolue par RMN (Slynko & al, 2009). Plus récemment ont été résolues les structures d'une MFP associée à un transporteur de la famille MFS dépourvue du domaine MP, EmrA d'*Aquifex aeolicus* et une MFP dépourvue du domaine α , BesA de *Borrelia burgdorferi* (Hinchliffe & al, 2014 ; Greene & al, 2013).

Le domaine α est constitué de deux hélices α antiparallèles ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) reliées par une boucle au sein d'une structure en épingle à cheveux (α -hairpin). Des expériences de cross-

link entre AcrA et TolC ont montré que ce domaine correspond au domaine d'interaction avec la protéine OMF (Lobedanz & al, 2007). Il a une longueur variable suivant les MFPs en fonction de l'insertion ou de la délétion de répétitions au sein des deux hélices α (Fig. 48). Chez CusB, ces hélices sont repliées sur elles-mêmes pour former une hélice supplémentaire contribuant ainsi à raccourcir le domaine α , tandis qu'EmrA présente un long domaine α qui traverse le périplasme. Quant à BesA, elle en est complètement dépourvue. Les raisons de l'absence de ce domaine chez BesA restent non définies mais certains auteurs suggèrent qu'elle serait due à l'absence de l'anneau Aspartate (voir § 4.1.2.1) chez son partenaire OMF, BesC, suggérant ainsi qu'une interaction directe avec l'extrémité périplasmique de BesA suffirait pour permettre l'ouverture du canal au cours de l'efflux (Bunikis & al, 2008).

Adjacent au domaine α , le domaine lipoyl a été décrit comme étant homologue au domaine de transport des groupements biotinyllipoyl des déshydrogénases (Johnson & Church, 1999 ; Higgins & al, 2004). Ce domaine est cependant dépourvu de la lysine modifiée par le lipoyl, caractéristique de ces enzymes. Son rôle exact est inconnu, cependant des expériences de mutagénèse dirigée et de cross-link, notamment du domaine lipoyl d'AcrA avec AcrB suggèrent qu'il est impliqué dans la stabilisation de la pompe, par interaction avec le domaine périplasmique du transporteur (Symmons & al, 2009). En cas de modification du domaine lipoyl, la MFP DevB, de la pompe à efflux de la famille ABC, DevBCA perd sa capacité d'oligomérisation, ce qui suggère que le domaine lipoyl pourrait également être impliqué dans l'oligomérisation de la MFP (Staron & al, 2014). Les domaines MP, β et lipoyl sont majoritairement constitués de brins β , les domaines MP et β étant coiffés d'une petite hélice α supplémentaire (respectivement α_4 et α_3). Le domaine β semble également impliqué dans l'oligomérisation de la MFP (Staron & al, 2014) et dans l'interaction avec le transporteur. Les structures des MFP (MacA, MexA) montrent que le domaine MP ne semble pas intervenir dans l'oligomérisation mais des études de cinétique ont montré qu'il est impliqué dans l'interaction avec le transporteur (Tikhonova & al, 2011). Certaines MFPs telles que EmrA sont cependant dépourvues du domaine MP, ceci pouvant s'expliquer par le fait qu'elles interagissent avec des transporteurs dépourvus de domaine périplasmique.

Les MFPs sont ancrées à la membrane interne soit grâce à une hélice α transmembranaire adjacente au domaine MP (MacA, EmrA), soit par l'acylation de la cystéine N-terminale du domaine MP (voir § 4.1.2.3). Certaines protéines telles que les

pompes à efflux de la famille des transporteurs RND spécifiques des métaux (CusB, ZneB) possèdent un domaine N- ou C-terminal supplémentaire (**Fig. 48**). Ces domaines semblent impliqués dans l'interaction avec le transporteur RND mais également dans l'interaction avec les protéines chaperonnes telles que CusF (Symmons & al, 2015). Les quatre domaines sont séparés par des linkers courts et flexibles, ce qui rend possible les changements conformationnels impliqués dans l'assemblage de la pompe (voir § 4.2).

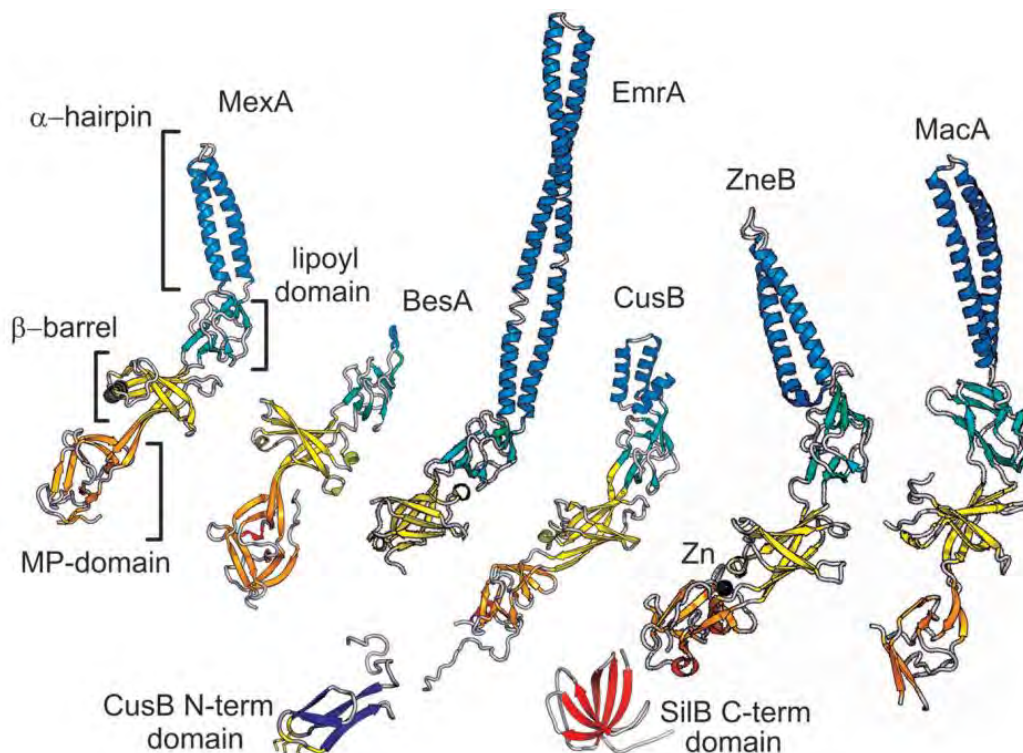


Figure 48 : Exemples de protéines de la famille des MFPs. Le domaine MP est représenté en orange, le domaine β en jaune, le domaine lipoyl en vert et le domaine α en bleu. Les domaines équivalents sont colorés de la même façon chez toutes les protéines représentées. Les MFPs présentent des domaines α de longueur variable et certaines sont dépourvues d'un domaine (BesA) tandis que d'autres présentent des domaines supplémentaires (CusB, ZneB). (Adapté de Symmons & al., 2015, *Frontiers in Microbiology*).

4.1.3.2. Oligomérisation des MFPs

L'oligomérisation des protéines MFP est indépendante de l'interaction avec les partenaires OMF et les partenaires de la membrane interne (RND, ABC, MFS). La première preuve de l'oligomérisation des MFPs provient d'études de cross-link *in vivo* d'AcrA et de HlyD (la MFP de la pompe à efflux de la famille ABC, HlyDB, impliquée dans la sécrétion de l'hémolysine A (HlyA) chez *E. coli*) (Zgurskaya & al, 2015). La stœchiométrie des MFPs au sein des oligomères a cependant longtemps été un sujet de débat. De nombreuses structures cristallographiques de MFPs ont permis de montrer qu'elles s'organisent en répétition de dimères (MexA, MacA, AcrA) et des études de cinétique ont montré que le dimère est nécessaire à la formation du complexe (Tikhonova & al, 2011). Le dimère a donc été défini comme l'unité fonctionnelle des protéines MFP. L'évidence naturelle de l'existence des MFPs en tant que dimère fonctionnel reste la pompe TriABC-OpmH de *P. aeruginosa*, spécifique de l'efflux du triclosan au sein de laquelle TriA et TriB sont des MFPs distinctes qui sont pourtant toutes les deux requises pour avoir un complexe fonctionnel.

La réalisation de différentes chimères *in vivo* et des études d'interaction *in vitro*, notamment l'étude de l'oligomérisation de la MFP DevB, de la pompe à efflux de la famille ABC, DevBCA, la structure de la MFP MacA ou encore la structure de CusB co-cristallisée avec le transporteur RND CusA, ont permis de montrer que les MFPs s'assemblent en trimères de dimères, formant ainsi des hexamères au sein du complexe (Yum & al, 2009 ; Su & al, 2011 ; Staron & al, 2014).

4.1.4. Les modulateurs des pompes à efflux

Plusieurs modulateurs de l'activité des pompes ont été décrits à ce jour. Une petite protéine de 49 résidus, AcrZ semble réguler l'activité de transport d'AcrB. Même si AcrZ n'est pas requise pour l'activité d'AcrB, cette protéine semble cependant favoriser le transport de certains antibiotiques, notamment la tétracycline, la puromycine et le chloramphénicol (Hobbs & al, 2012 ; Storz & al, 2014). La structure cristallographique du

complexe AcrB/AcrZ montre qu'AcrZ forme une hélice transmembranaire qui traverse le domaine transmembranaire d'AcrB (Du & al, 2014) (**Fig. 49**). La surface d'interaction entre AcrZ et AcrB étant conservée chez des homologues, il existe probablement des homologues d'AcrZ qui régulent l'activité d'autres transporteurs de la famille RND. Aucun analogue d'AcrZ n'a cependant été décrit à ce jour chez *P. aeruginosa*. Le mécanisme de régulation de l'activité d'AcrB par AcrZ reste à définir mais il semble que ce mécanisme implique des changements conformationnels des poches de fixation ou de l'organisation des lipides autour des sites d'entrée des antibiotiques.

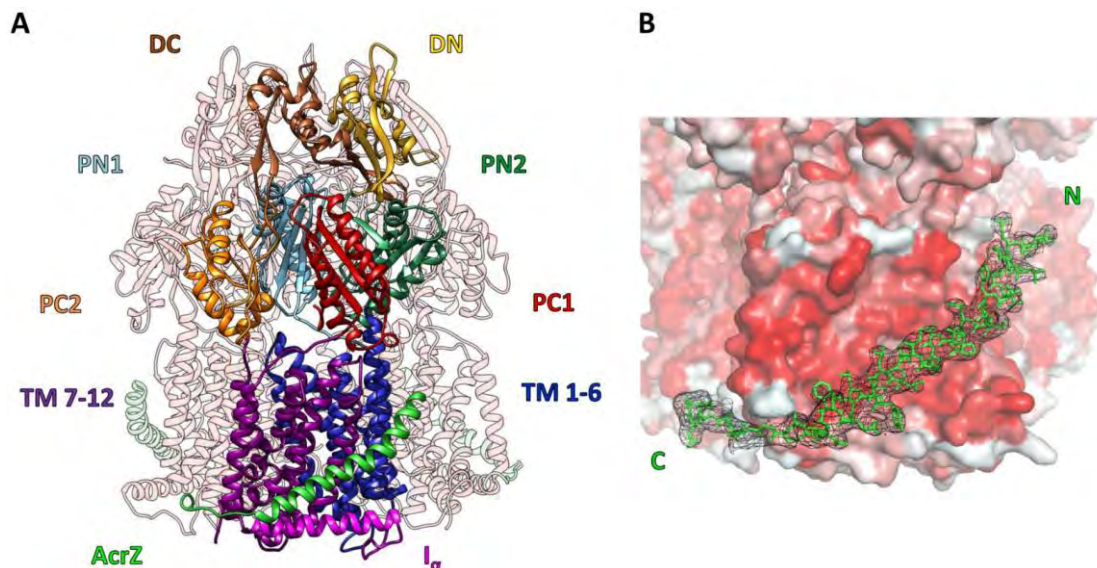


Figure 49 : Structure du transporteur RND AcrB en complexe avec AcrZ. L'un des monomères d'AcrB est représenté et AcrZ (en vert) forme une hélice α et est représenté à la surface de ce monomère au niveau du domaine transmembranaire (A). La carte de densité électronique d'AcrZ est représentée (B) et les résidus environnants d'AcrB sont représentés en fonction de leur hydrophobicité (hydrophobe en rouge et hydrophile en blanc). (Adapté de Du & al, 2014, Nature). Code PDB : 4CDI.

L'opéron *cus* code, en plus de la pompe CusCBA, pour une protéine périplasmique, CusF, qui sert de protéine chaperonne. CusF a été décrite comme étant impliquée dans le transport des métaux (Cu, Ag) et leur transfert vers le transporteur CusB. Ce transfert

semble constituer l'étape initiale de l'efflux des métaux par la pompe CusCBA (Delmar & al, 2013) (**Fig. 50**). CusF semble également moduler l'interaction entre CusB et CusA (Anes & al, 2015).

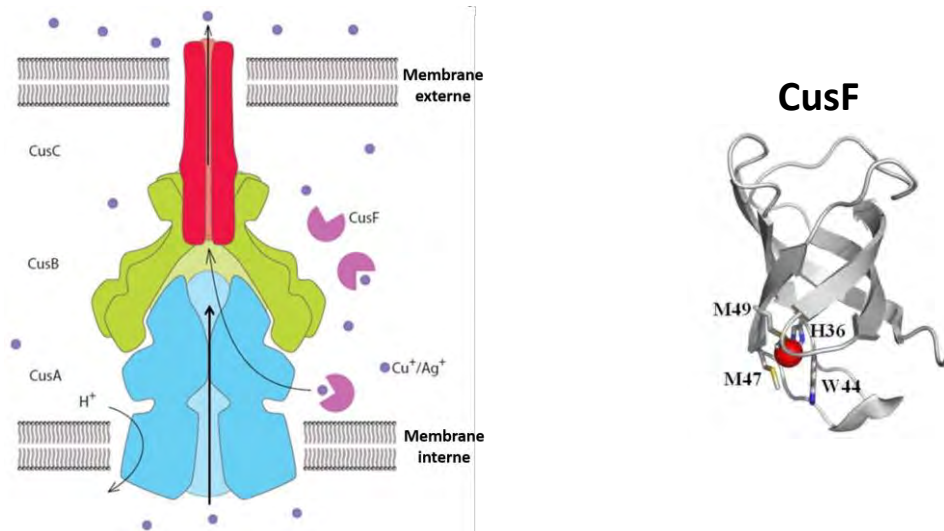


Figure 50 : Modèle de la pompe d'efflux CusCBA. La chaperonne périplasmique CusF est impliquée dans le transfert de protons au transporteur CusA. La structure de CusF (à droite) montre les résidus impliqués dans la fixation des ions métalliques. (Adapté de Delmar & al, 2013, Biometals). Code PDB : 2QCP.

4.1.5. Les pompes d'efflux non conventionnelles

Les pompes d'efflux conventionnelles précédemment décrites sont des systèmes à trois composantes. Il existe cependant des assemblages asymétriques qui incluent une quatrième composante tels que les pompes TriABC-OpmH et MexGHI-OpmD de *P. aeruginosa*, MdtABC et MdtUVW d'*E. coli* et d'*Erwinia amylovora* (**Fig. 51**).

La pompe TriABC impliquée dans l'efflux du triclosan est constituée de deux MFPs distinctes, TriA et TriB (Mima & al, 2007) et d'un transporteur RND TriC. Les deux MFPs présentent 36% d'identité de séquence et sont toutes les deux requises pour le fonctionnement de la pompe. Leur différence de séquence ainsi que le fait qu'elles soient

toutes les deux requises pour l'efflux suggèrent des interactions différentes avec le transporteur (Weeks & al, 2015).

La pompe MexGHI-OpmD est impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa* et sa surexpression entraîne une résistance à la norfloxacine, au bromure d'éthidium, à l'acriflavine et à la rhodamine 6G. MexH, MexI et OmpD sont respectivement les protéines MFP, RND et OMF. MexG est une protéine de 16,2 kDa dont la fonction est inconnue. Le complexe MexHI-OpmD est fonctionnel mais MexG est requise pour une activité complète (Zgurskaya & al, 2015).

Les pompes MdtABC et MdtUVW sont impliquées respectivement dans l'efflux de la josamycine, des sels biliaires, du nitrate d'argent et du clotrimazole chez *E. coli* et *Erwinia amylovora*. Ces pompes sont constituées de deux transporteurs RND, MdtB et MdtC pour l'une et MdtV et MdtW pour l'autre, MdtA et MdtU correspondant aux MFPs (Nagakubo & al, 2002 ; Pletzer & Weingart, 2014). Les pourcentages d'identité de séquence sont indiqués par le **Tableau 2**.

<i>E. coli</i>	MdtB	81%	MdtB	61%	MdtC	74%	MdtC	56%
<i>Erwinia amylovora</i>	MdtB		MdtV		MdtC		MdtW	
<i>E. coli</i>	MdtB	50%	<i>Erwinia amylovora</i>	MdtB	59%	MdtC	54%	
	MdtC			MdtV		MdtW		

Tableau 2 : Pourcentages d'identité de séquence entre les transporteurs RND des pompes MdtABC et MdtUVW d'*E. coli* et d'*Erwinia amylovora*. (Adapté de Pletzer & Weingart, 2014, BMC Microbiology.

Chez *E. coli*, le complexe MdtAB n'est pas fonctionnel tandis que le complexe MdtAC présente une activité partielle. Les expériences de co-purification et les constructions de protéines chimériques ont permis de montrer que le complexe RND est un hétérotrimère constitué de deux monomères de MdtB pour un monomère de MdtC. Des expériences de mutagenèse dirigée ont par ailleurs permis de montrer que les deux protéines ont des rôles

différents au sein du transporteur, notamment dans le transfert de protons et dans la fixation du substrat, contrairement aux pompes canoniques au sein desquelles les trois monomères du transporteur fonctionnent de façon identique (Zgurskaya & al, 2015).

Ces pompes asymétriques à quatre composantes semblent indiquer que le modèle actuel de la pompe tripartite est incomplet et qu'il est possible que des composantes supplémentaires soient nécessaires pour le fonctionnement total des pompes ainsi que pour les changements conformationnels des différentes sous-unités de ces pompes.

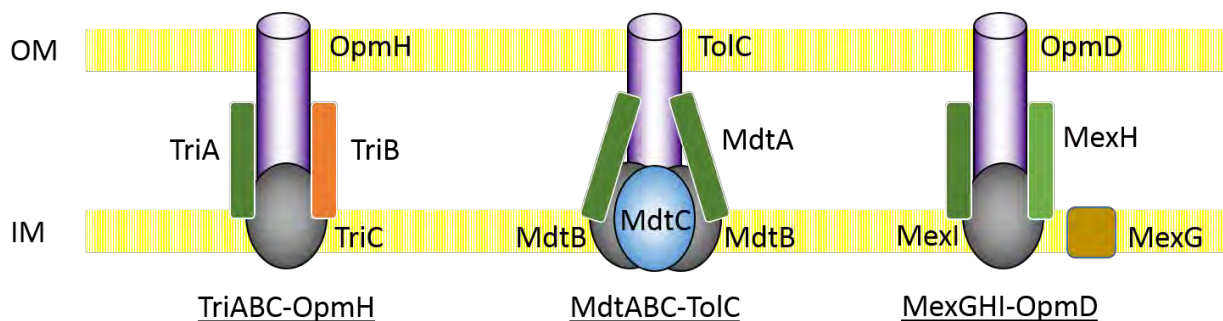


Figure 51 : Modèles de trois pompes d'efflux à quatre composantes. Les pompes TriABC-OpmH et MexGHI-OpmD sont des pompes à efflux de *Pseudomonas aeruginosa* et la pompe MdtABC-TolC est une pompe à efflux d'*Escherichia coli*. Pour chaque pompe, la protéine OMF de la membrane externe est représentée en violet, la MFP en vert et orange, le transporteur RND en gris et bleu. L'OMF et le transporteur RND sont des homotrimères, sauf pour la pompe MdtABC-TolC, dont le transporteur RND est un hétérodimère formé d'un homodimère de MdtB et d'un monomère de MdtC. La protéine additionnelle de la pompe MexGHI-OpmD est représentée en marron.

4.2. Assemblage de la pompe tripartite

Chez les bactéries Gram négatif, les trois composantes RND, MFP et OMF s'assemblent au sein d'un complexe tripartite pour former les pompes à efflux qui permettent le transport des molécules depuis la membrane interne et le périplasma vers l'extérieur de la cellule. Cet assemblage nécessite un jeu d'interactions, notamment entre la

protéine OMF et le transporteur RND, entre la protéine OMF et la protéine MFP et entre la protéine MFP et le transporteur RND, ce qui a donné lieu à différents modèles d'assemblage.

La stœchiométrie de la MFP a longtemps été (et continue d'être) un sujet de débat. Elle a donné lieu à plusieurs modèles d'assemblage, notamment les modèles de Fernandez-recio ou de Symmons correspondant à une stœchiométrie OMF-MFP-RND 3 :3 :3, le modèle de Higgins correspondant à une stœchiométrie 3 :9 :3 ou encore le modèle de Xu correspondant à une stœchiométrie 3 :6 :3 (Fernandez-Recio & al, 2004 ; Higgins & al, 2004 ; Symmons & al, 2009 ; Xu & al, 2011). Certains modèles décrivaient même une stœchiométrie allant jusqu'à 12 MFPs au sein du complexe (Akama & al, 2004). Les nombreuses structures cristallographiques de MFPs ainsi que les expériences de cinétique, d'interaction, de mutagenèse et de cross-link tendent cependant à converger vers le modèle 3 :6 :3.

La pompe la mieux caractérisée est la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli*. La structure de la pompe entière reconstituée *in vitro*, résolue à 16 Å par cryo-microscopie électronique par Du et al (Du & al, 2015) couplée au docking des structures cristallographiques individuelles des différents composants de la pompe (AcrA, AcrB, AcrZ et TolC) dans la carte de microscopie électronique (**Fig. 52**), a permis de décrire un modèle d'assemblage qui montre que la pompe est constituée par l'assemblage d'un trimère de TolC, d'un hexamère d'AcrA et d'un trimère d'AcrB, confirmant ainsi la stœchiométrie OMF-MFP-RND 3 :6 :3. La stœchiométrie RND-MFP 3 :6 avait été préalablement décrite grâce à la structure du complexe bipartite CusA-CusB de la pompe CusCBA impliquée dans l'efflux des métaux chez *E. coli*.

Ces données sont également en accord avec des résultats de cross-link entre AcrA et AcrB chez *Neisseria gonorrhoeae* ainsi qu'avec des résultats de cross-link et de mutagenèse qui montrent qu'un dimère d'AcrA se lie à un monomère de TolC, décrivant ainsi la stœchiométrie OMF-MFP 3 :6 (Stegmeier & al, 2006 ; Janganan & al, 2011). La structure de la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, également résolue par cryo-microscopie électronique à 25 Å par Daury et al (Daury & al, 2016) confirme également la stœchiométrie 3 :6 :3. Les études de cinétique et d'interaction ont permis de déterminer les sites d'interaction entre les différents partenaires et elles ont également permis de décrire des événements séquentiels impliqués dans l'assemblage (Touzé & al, 2004 ; Tikhonova & al, 2011).

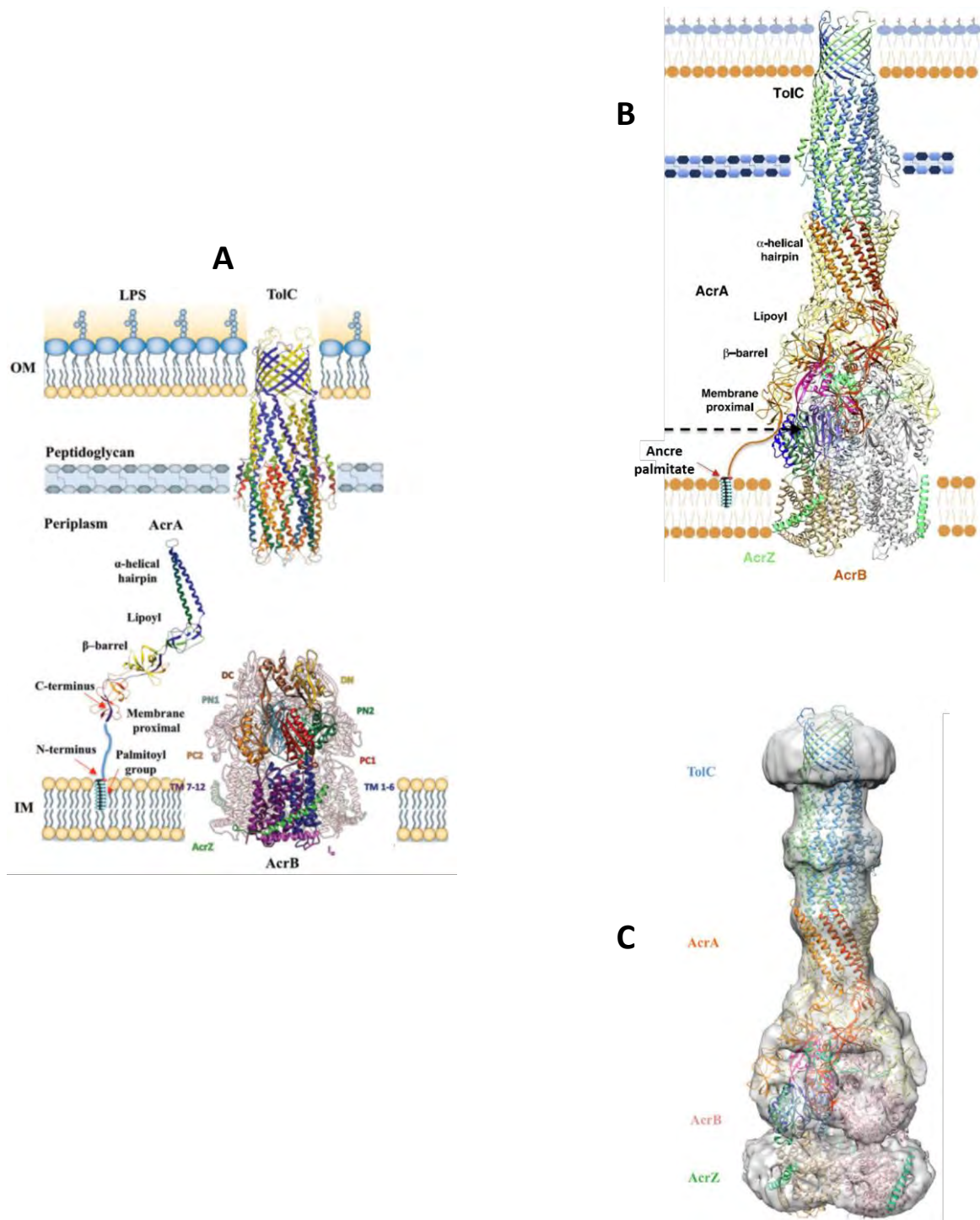


Figure 52 : Structures individuelles des composants OMF (TolC), MFP (AcrA) et RND (AcrB) et du modulateur AcrZ (A) et modèle de la pompe assemblée (B) reconstituée à partir de la structure obtenue par microscopie électronique (C). (Adapté de Du & al, 2015, Biological Chemistry).

Par ailleurs, Il est intéressant de noter que les OMFs TolC et OprM sont capables d'interagir avec différentes pompes d'efflux : les pompes de la famille MFS EmrAB, de la famille RND AcrAB et de la famille ABC MacAB pour TolC et les pompes de la famille RND MexAB, MexXY, MexJK, MexVW, MexMN pour OprM.

4.2.1. Le rôle de la MFP au sein du complexe

Le domaine α des protéines MFP présente des similitudes avec le domaine coiled-coil de l'OMF (**Fig. 53**). Les deux domaines, notamment le domaine α de ZneB et le domaine coiled-coil de TolC, inversés et placés dans la même orientation présentent des torsions similaires et se superposent parfaitement. Il a été montré que les MFPs MacA, AcrA et MexA forment des hexamères (§ 4.1.3.2) constituant un canal dont l'extrémité supérieure formée par les domaines α s'ouvre sur l'OMF, l'extrémité inférieure formée par les domaines proximaux (MP) s'ouvrant sur la RND, avec une constriction au niveau du domaine lipoyl. Ces hexamères s'insèrent parfaitement au niveau de crevasses (nommées « groove ») localisées entre les hélices internes (H8 et H4) et les hélices externes (H3, H7) intra- et intermonomériques du domaine coiled-coil de TolC (Symmons & al, 2015). Le domaine α des MFP constitue donc le domaine d'interaction avec l'OMF au cours de l'assemblage. Des études de cross-link entre AcrA et TolC ont d'ailleurs permis de confirmer cette interaction (Lobedanz & al, 2007). L'importance du domaine coiled-coil au cours de cette interaction est suggérée par le fait que la mutation des quelques résidus contribue à modifier la spécificité de l'OMF pour des MFPs données (Bokma & al, 2006 ; Vedyappan & al, 2006 ; Phan & al, 2015). Les domaines lipoyl des MFPs interagissent principalement les uns avec les autres au cours de l'oligomérisation des MFPs mais également avec le transporteur.

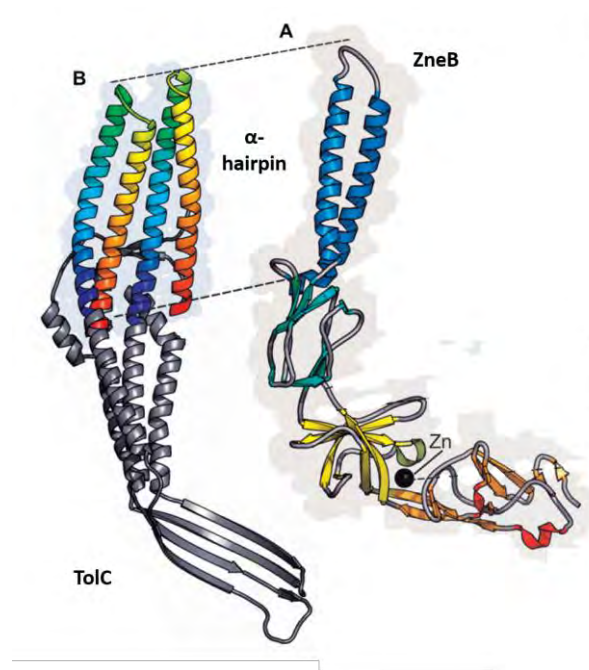


Figure 53 : Comparaison structurale du domaine coiled-coil de l'OMF TolC (A) et du domaine α de la MFP ZneB (B). Les domaines équivalents chez les deux protéines sont reliés par des pointillés. (Adapté de Symmons & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

Les interactions entre MFP et RND sont similaires à celles qui ont été décrites grâce à la structure cristallographique du complexe bipartite CusBA (Su & al, 2011) (**Fig. 54**). Cette structure montre que les structures en épingle à cheveux β (β -hairpin) des sous-domaines DN et DC de CusA interagissent avec le domaine β de CusB au cours de l'assemblage. Un mutant d'AcrB, délété des structures β -hairpin du sous-domaine DN a permis de montrer que cette interaction est importante pour le bon assemblage de l'hexamère d'AcrA, car ce mutant est incapable de se lier au domaine β d'AcrA (Weeks & al, 2014). Cette interaction a également été décrite par des expériences d'interaction par titration calorimétrique (ITC) (Touzé & al, 2004) et elle implique également les domaines PC1, PC2 et PN2 d'AcrB. Or, la crevasse formée par les domaines PC1 et PC2 a été décrite comme étant une porte d'entrée des substrats (§ 4.1.1.2). La MFP pourrait donc être impliquée dans la régulation de l'activité du transporteur au cours de la fixation du substrat. Des expériences de transport *in vitro* ont

d'ailleurs permis de montrer que l'activité de transport de MexB augmente en présence de MexA (Verchère & al, 2015).

Les études de cinétique ont par ailleurs permis de montrer que les domaines d'interaction avec le partenaire de la membrane interne varient suivant la nature du partenaire. EmrA et MacA, qui fonctionnent respectivement avec des transporteurs de la famille MFS et ABC, interagissent avec leurs partenaires avec une affinité plus forte qu'AcrA. Les transporteurs MFS et ABC étant dépourvu de large domaine périplasmique, contrairement aux transporteurs RND, ces résultats suggèrent que le domaine périplasmique des transporteurs RND stabilise l'oligomérisation des MFPs partenaires. Les MFPs qui fonctionnent avec ces transporteurs RND ont cependant une forte propension à l'auto-oligomérisation. L'ensemble des études sur l'oligomérisation des MFPs a permis de montrer que cette oligomérisation est nécessaire pour cloisonner l'ouverture entre l'OMF et le transporteur au cours de l'efflux.

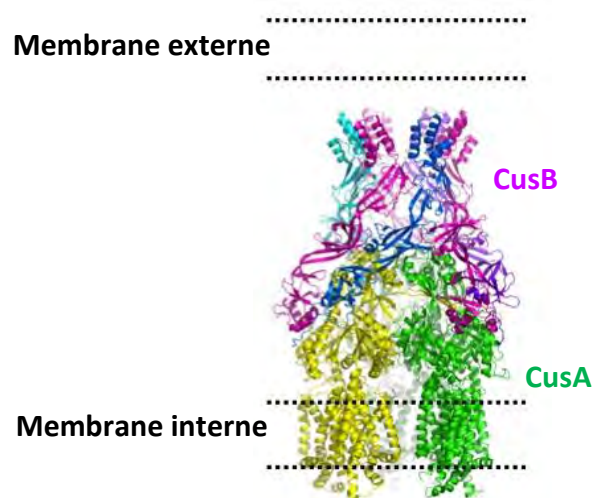


Figure 54 : Structure du complexe bipartite CusBA. La MFP CusB forme un hexamère qui s'associe au transporteur trimérique CusA. (Adapté de Su & al, 2011, Nature). Code PDB : 3NE5.

L'interaction MFP-RND semble également dépendre des changements conformationnels du transporteur. En effet, des études de complémentation *in vivo* ont montré que la MFP se lie au transporteur RND sous sa forme protonée (Janganan & al, 2013). La MFP semble ainsi stabiliser le transporteur au cours de la transition T \rightarrow O (fixation \rightarrow extrusion, voir § 4.1.1.3), avant le transfert transmembranaire de protons. Le rôle de la MFP dans l'activation de la force protomotrice est par contre encore peu exploré. La MFP pourrait également être impliquée dans la spécificité du transporteur. Des expériences de complémentation étudiant l'interaction entre AcrA et MexB ont permis de montrer qu'AcrA change la spécificité de la pompe, permettant la résistance au SDS, une résistance partielle à la novobiocine et au bromure d'éthidium, tandis que d'autres substrats de MexB tels que l'acide nalidixique, la lincomycine et l'érythromycine ne sont pas efflués et restent très toxiques (Krishnamoorthy & al, 2008).

Cette interaction MFP-RND est également nécessaire au recrutement de l'OMF. Des expériences de co-immunoprécipitation et de transport *in vitro* réalisées avec la pompe MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*, ou des expériences de cinétique par SPR réalisées avec la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli*, ont permis de montrer qu'OprM ne forme pas de complexe avec MexB en absence de MexA, empêchant ainsi l'efflux (Verchère & al, 2015 ; Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015) et que le complexe bipartite AcrA-AcrB est nécessaire pour le recrutement de TolC (Tikhonova & al, 2011). Même si les résultats de cinétique ont permis de montrer une interaction entre TolC et AcrB (Tikhonova & al, 2011), cette interaction n'est pas détectée par ITC, et le complexe OprM-MexB n'est pas co-immunoprécipité (Touzé & al, 2004 ; Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015), indiquant certainement une instabilité du complexe OMF-RND lié à l'absence de la MFP.

Le domaine proximal (MP) de la MFP ainsi que l'ancre lipidique de la MFP semblent également importants pour l'interaction avec la RND. En effet, des mutations du domaine proximal d'AcrA (notamment la mutation G363C) ainsi que la délétion de l'ancre lipidique d'AcrA ou de MexA empêchent la formation du complexe bipartite respectivement avec AcrB ou MexB (Tikhonova & al, 2011 ; Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015). Enfin, le complexe bipartite MFP-RND régule la spécificité d'interaction avec l'OMF. La reconstitution *in vitro* des pompes AcrAB-TolC, MexAB-OprM et de la pompe chimérique AcrA-MexB-OprM a permis de montrer la spécificité de l'interaction avec l'OMF (TolC ou OprM) car la

proportion de pompes chimériques AcrA-MexB-OprM reconstituées est faible par rapport à la proportion de pompes natives MexAB-OprM ou AcrAB-TolC (Daury & al, 2016).

4.2.2. L'effet de l'ouverture de l'OMF sur l'assemblage

L'efflux nécessite l'ouverture du canal OMF. Le modèle de la pompe AcrAB-TolC entière obtenu grâce à la cryo-microscopie électronique (Du & al, 2015) (§ 4.2) montre le canal en conformation ouverte. Cependant, comme le montrent des modèles précédents (Tamura & al, 2005 ; Symmons & al, 2009), cette ouverture semble indépendante des changements conformationnels d'AcrB, notamment à cause du mécanisme d'efflux péristaltique séquentiel (§ 4.1.1.2). L'efflux du substrat fixé par l'« extrusion monomer » implique une ouverture préalable du canal et suggère que le canal serait ouvert pendant la durée de l'efflux.

Par contre, le modèle de Du et al, ainsi que des études de complémentation *in vivo*, notamment l'étude de l'influx de la vancomycine par la pompe à efflux MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* montre que l'interaction avec la MFP est requise pour l'ouverture du canal. La vancomycine est un antibiotique qui est incapable de traverser la membrane externe par diffusion passive à cause de sa taille importante et qui ne peut rentrer dans la cellule que par l'intermédiaire d'un canal ouvert. La complémentation *in vivo* a montré que la co-expression de la MFP (MtrC) et de l'OMF (MtrE) rend les bactéries sensibles, impliquant ainsi l'entrée de la vancomycine. La MFP contribue donc à l'ouverture du canal. Par contre, une version tronquée de la MFP contenant uniquement le domaine α ne permet pas l'ouverture de l'OMF (Janganan & al, 2013). Or, les domaines manquants (les domaines β , lipoyl et MP) correspondent aux domaines d'interaction avec le transporteur, ce qui suggère que, même si cette ouverture est indépendante des changements conformationnels du transporteur, l'interaction du transporteur avec la MFP semble requise pour permettre l'ouverture du canal.

Cependant, même si le canal est ouvert pendant la durée de l'efflux, l'assemblage s'effectue avec le canal en conformation fermée et le recrutement de l'OMF contribue à

stabiliser l'hexamère formé par la MFP. Des études de cinétique par SPR ont en effet permis de montrer qu'un mutant de TolC, TolC^{YFRS} (Y362F et R367S), artificiellement ouvert, n'interagit ni avec AcrA, ni avec AcrB. Ces résultats suggèrent par contre que l'ouverture du canal conduit à la dissociation de la pompe après l'efflux, car les auteurs observent une diminution de l'affinité de l'OMF en conformation ouverte pour ses partenaires MFP et RND.

4.2.3. L'effet de la force protomotrice (PMF) sur l'assemblage

Même si l'efflux nécessite une source d'énergie (voir § 4.1.1.3), plusieurs études ont montré que l'assemblage n'en nécessite pas (Tikhonova & al, 2011 ; Janganan & al, 2013 ; Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015). La reconstitution de pompes à efflux en présence d'inhibiteurs de la force protomotrice (CCCP, valinomycine) n'affecte pas l'assemblage. Par ailleurs, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer que le mutant D407N de MexB, dont la fonction de transfert de protons est abolie, n'affecte pas l'assemblage de la pompe MexAB-OprM (Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015). L'assemblage réalisé avec un mutant similaire (D408A) d'AcrB est également possible pour la pompe AcrAB-TolC (Tikhonova & Zgurskaya, 2004).

Il a été montré précédemment que l'ouverture du canal conduit à la dissociation de la pompe et la PMF semble également y contribuer. Des mutants non fonctionnels de MtrD, mutés au niveau des résidus D405, D406 et K948, impliqués dans le transfert de protons, et exprimés avec la MFP et l'OMF, confèrent une résistance à la vancomycine, indiquant que la pompe n'est pas dissociée (Bavro & al, 2008). Ces résultats indiquent de façon indirecte que la PMF est nécessaire à la dissociation de la pompe mais également à l'ouverture du canal médiée par la MFP. La MFP contribuerait ainsi au transfert de l'énergie nécessaire à l'ouverture de l'OMF, énergie qui est fournie par le transporteur.

4.2.4. Le mécanisme d'efflux

Sur la base des données décrites précédemment, un mécanisme d'assemblage et d'efflux en quatre étapes a été proposé par Janganan & al et Zgurskaya & al pour les pompes MtrCDE et TolC-RND ou TolC-ABC (Janganan & al, 2013 ; Zgurskaya & al, 2015) (**Fig. 55**). Les deux mécanismes concordent et peuvent donc être appliqués aux autres pompes à efflux tripartites. Ce mécanisme implique une coopérativité entre l'efflux et l'assemblage et suggère que les transporteurs et les MFPs existent dans la membrane interne sous forme de complexes bipartites inactifs. Le recrutement d'une OMF par la MFP (**1**) conduit à l'activation du complexe bipartite et induit des changements conformationnels de la MFP nécessaire pour la stimulation du transporteur. Le complexe bipartite activé permet l'ouverture de l'OMF pour l'efflux du substrat (**2**). Le recrutement de l'OMF semble être dépendant de la fixation d'un substrat par le complexe bipartite. Il a en effet été montré que la pompe MexJK de *P. aeruginosa* recrute OprM ou OpmH suivant la nature du substrat (Chuanchien & al, 2005). Le substrat est ensuite transporté à travers le complexe entier vers le milieu extracellulaire grâce à la force protomotrice (**3**). Le complexe est ensuite dissocié après le cycle d'efflux (**4**).

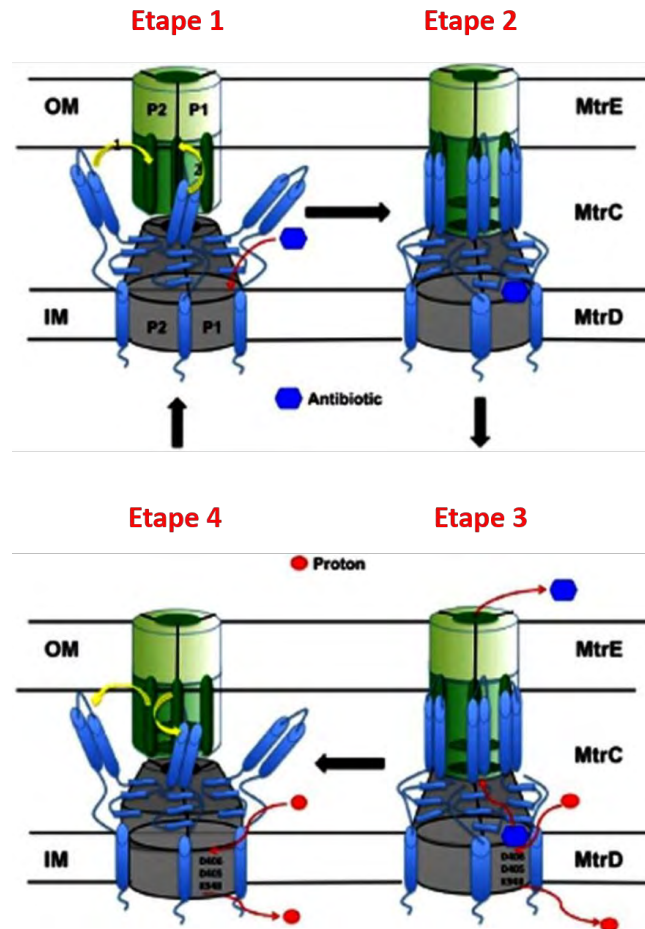


Figure 55 : Mécanisme d'assemblage et d'efflux séquentiel de la pompe MtrCDE. (Adapté de Janganan & al, 2013, Molecular Microbiology).

4.2.5. Les modèles d'assemblage de la pompe tripartite

En absence de structures à haute résolution de la pompe entière, plusieurs modèles d'assemblage ont été décrits sur la base des structures des composants individuels et sur la base de complexes bipartites (CusBA). Deux principaux modèles ont été décrits, le modèle court qui implique l'interaction directe de l'OMF avec le transporteur RND et le modèle long qui implique l'interaction entre l'OMF et le transporteur RND médiée par la MFP (**Fig. 56**).

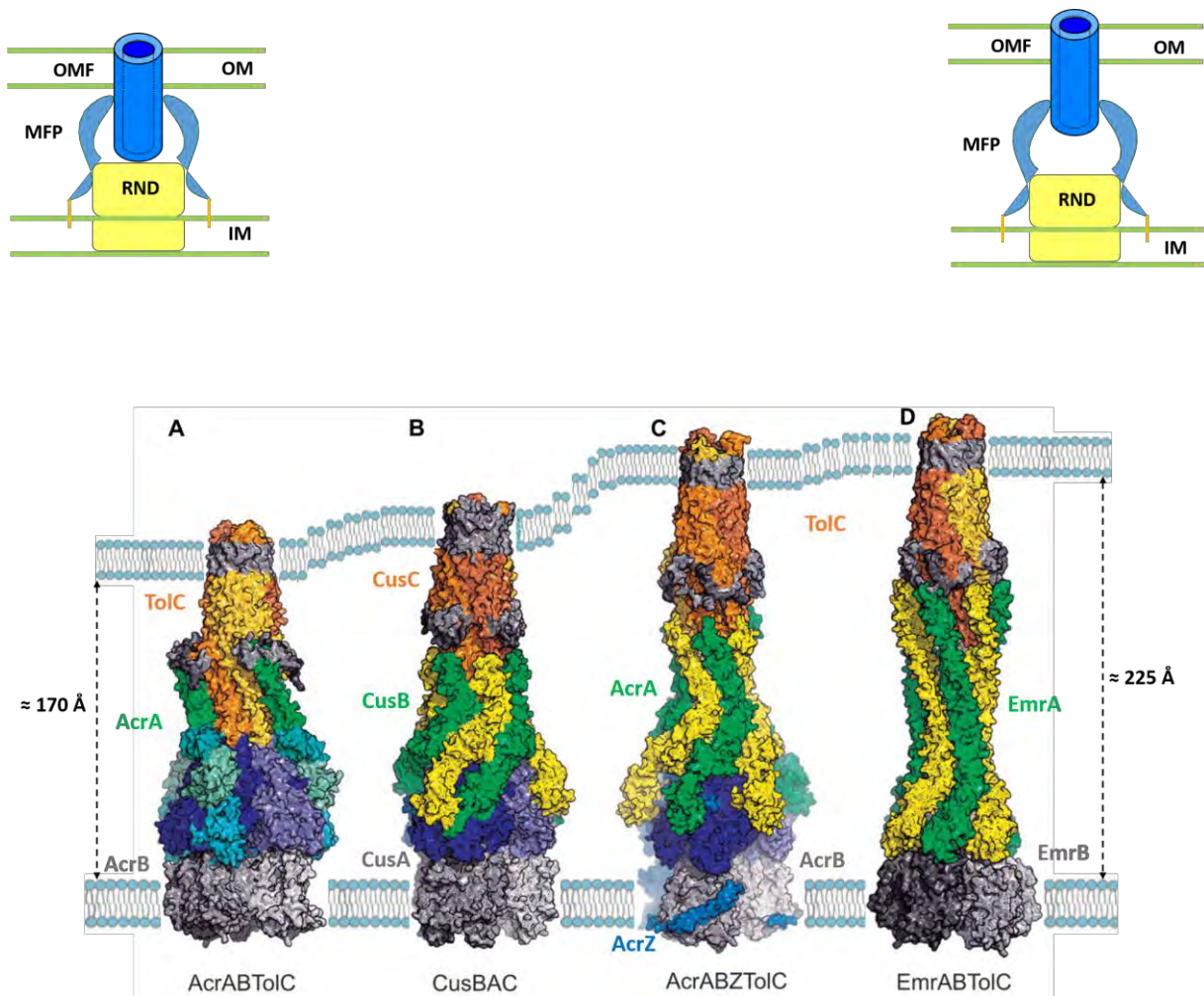


Figure 56 : Modèles d'assemblage de la pompe tripartite. Les modèles vont du modèle court (panneau supérieur, à gauche), représenté par la pompe AcrAB-TolC, qui présente une interaction directe entre l'OMF (TolC) et le transporteur RND (AcrB), au modèle long (panneau supérieur, à droite), représenté par la pompe EmrAB-TolC, qui présente une interaction indirecte entre l'OMF (TolC) et le transporteur RND (EmrB), médiée par la MFP (EmrA). **OM** : membrane externe ; **IM** : membrane interne. (Adapté de Symmons & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

4.2.5.1. Le modèle court

Il s'agit du modèle privilégié depuis la résolution de la première structure d'un transporteur RND, AcrB (Murakami & al, 2002). Ce modèle, corroboré par la complémentarité structurale du domaine d'amarrage d'AcrB et de l'extrémité périplasmique

de TolC, implique un contact direct entre TolC et AcrB au niveau du périplasma. Cette interaction directe a été démontrée grâce à des études d'interaction *in vivo* par cross-link via des cystéines modifiées des boucles périplasmiques de TolC et des structures β -hairpin d'AcrB (Tamura & al, 2005). Des études de cinétique sont également en faveur de ce modèle car elles montrent que TolC et AcrB peuvent interagir indépendamment d'AcrA (Tikhonova & al, 2011). Cependant, l'incubation simple de TolC avec AcrB, ou encore la co-immunoprécipitation d'OprM en présence de MexB ne produit pas de complexe, même en présence de cross-linkers additionnés pour étudier l'affinité entre les composants (Touzé & al, 2004 ; Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015). Par conséquent, ceci suggère que les MFPs sont nécessaires pour stabiliser le complexe. Des expériences de cross-link entre TolC et AcrA ont d'ailleurs permis de déterminer la surface d'interaction de TolC avec AcrA (Lobedanz & al, 2007). AcrA se lie aux crevasses (« grooves ») de TolC et permettrait ainsi de rapprocher l'OMF et le transporteur RND dans le modèle court, grâce à sa structure flexible. Des mutants « gain de fonction » de VceC confirment également ce modèle. Des mutations localisées au niveau de l'extrémité périplasmique de VceC (un analogue structural de TolC), notamment la mutation V445E (équivalent du résidu D373 de l'anneau anionique chez TolC, voir § 4.1.2.1) permet d'introduire un anneau anionique similaire à celui de TolC, favorisant ainsi l'interaction de VceC avec la pompe AcrAB (Vediyappan & al, 2006)

4.2.5.2. Le modèle long

Le modèle structural de la pompe entière MexAB-OprM, proposé par Higgins et al (Higgins & al, 2004) est le premier modèle à décrire une absence d'interaction entre l'OMF (OprM) et le transporteur RND (MexB). Ce modèle sera suivi par celui de Xu et al (Xu & al, 2011) qui montre la même absence d'interaction. Les structures de la MFP MacA et du complexe bipartite CusBA, résolues par la suite sont en faveur de ces modèles (Yum & al, 2009 ; Su & al, 2011). MacA forme un cylindre hexamérique dont les diamètres au niveau des domaines α et au niveau des domaines proximaux MP correspondent respectivement au diamètre de l'extrémité périplasmique de TolC et au diamètre du domaine d'amarrage de MacB, suggérant ainsi une interaction indirecte entre l'OMF et le transporteur RND via la

MFP. La structure du complexe bipartite CusBA montre quant à elle que CusB forme un anneau hexamérique (tout comme MacA) autour de CusA. Le diamètre de cet anneau au niveau des domaines α de CusB est cependant trop étroit pour permettre le passage de l'OMF CusC (qui a une structure similaire à celle de TolC) à travers l'anneau, et donc une interaction directe avec CusA. Cette structure suggère ainsi une interaction entre l'extrémité périplasmique de CusC et l'extrémité des domaines α de l'hexamère formé par CusB. De plus, CusB présente un domaine α court et en extrapolant aux autres MFPs telles que MexA, AcrA, ou encore EmrA, cette observation renforce l'idée que l'OMF n'est pas en contact direct avec le transporteur RND avec ce type de MFP. Car plusieurs MFPs peuvent interagir avec la même OMF, c'est le cas de TolC qui interagit aussi bien avec AcrA qu'avec MacA ou EmrA. Or, ces MFPs présentent des domaines α de longueur variables alors que la surface d'interaction de l'OMF reste inchangée. Dans le cas d'EmrA, qui présente un très long domaine α , la conformation présentant le moins de contraintes pour la MFP correspond à une structure allongée au sein de laquelle il n'y a pas d'interaction possible entre l'OMF et le transporteur RND (**Fig. 56**) (Symmons & al, 2015). De plus, des structures et des modèles obtenus par cryo-microscopie électronique (Du & al, 2015 ; Daury & al, 2016) ou par coloration négative (Kim & al, 2015) sont en accord avec ce modèle. Elles montrent en effet que l'interaction OMF-MFP est limitée à l'extrémité des domaines α de l'hexamère. En dehors des structures de cryo-microscopie électronique, des études d'interaction par SPR de la pompe de la famille ABC, DevBCA ont également permis de montrer que l'extrémité des domaines α de DevB est requise pour l'interaction avec TolC (Staron & al, 2014), confirmant ainsi l'interaction médiée par la MFP.

Ces observations posent la question de l'existence concomitante des deux conformations, suggérant ainsi que l'une ou l'autre de ces conformations pourrait correspondre soit à un état fonctionnel, soit à un état transitoire de la pompe.

5. Stratégies d'étude des pompes à efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*

Les pompes à efflux, notamment celles de la famille RND, contribuent de façon significative à la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. L'une des différentes stratégies mises en place pour contrer l'efflux est de développer des antibiotiques qui ne sont pas substrats de ces pompes mais également de développer des inhibiteurs de l'activité des pompes ou de leur assemblage. Ces antibiotiques pourront ainsi être utilisés comme adjuvants en combinaison avec des antibiotiques classiques, afin de restaurer leur activité. Quelle que soit la stratégie, elle nécessite de caractériser les substrats des pompes au niveau moléculaire, de comprendre le mécanisme d'assemblage et de fonctionnement des pompes.

Les pompes à efflux, et notamment les quatre pompes présentant un intérêt clinique (MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN et MexCD-OprJ), présentent des différences de spécificité de substrats (voir § 2.2.3) allant des molécules amphiphiles (MexB) aux molécules hydrophobes (MexB, MexD) ou encore aux aminoglycosides polycationiques (MexY). Plusieurs méthodes et techniques ont été mises en œuvre afin d'étudier et de comprendre l'efflux, y compris des techniques développées à l'origine pour des études autres que l'efflux (Dreier & Ruggerone, 2015). La suite de cette description présente ces différentes méthodes de façon non exhaustive.

5.1. Etude de l'effet de l'efflux sur l'activité des antibiotiques

Plusieurs études impliquant la délétion des pompes ou encore l'étude de la sensibilité d'isolats cliniques à différents antibiotiques ont permis de sélectionner des mutants résistants surexprimant ces pompes (Masuda & al, 2000 ; Schweizer, 2003 ; Poole, 2000, 2004, 2005 ; Purssell & Poole, 2013). Ces études, réalisées par complémentation *in vivo* et mesure de concentration minimale inhibitrice (CMI) ont permis de montrer que la sensibilité de *P. aeruginosa* à plusieurs antibiotiques a été restaurée grâce la délétion de l'une ou l'autre des quatre pompes précédemment citées (Morita & al, 2001). La plupart des antibiotiques sont des composés amphiphiles avec des domaines hydrophobes, on observe

cependant des différences notables au cours de l'efflux, y compris au sein d'une même classe d'antibiotiques (Yu & al, 2003 ; Delcour, 2009 ; Brown & al, 2014). La tigécycline, qui a été développée sur la base de la structure de la tétracycline, est un antibiotique qui n'est pas substrat des pompes de la famille MFS, mais qui reste un substrat des pompes de la famille RND (MexY, MexB et MexD) chez *P. aeruginosa* (Dean & al, 2003 ; Visalli & al, 2003). Ce résultat illustre la flexibilité des pompes.

Cependant, la capacité des pompes à exporter un antibiotique donné n'est pas la même pour tous les antibiotiques appartenant à la même famille. Plusieurs auteurs ont montré que certaines pompes à efflux présentent une préférence pour les quinolones et que l'efflux s'effectue avec une différence de spécificité suivant la nature des quinolones. Les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine ou la norfloxacine sont exportées de façon efficace par les pompes MexEF-OprN et MexCD-OprJ, leur efflux par les pompes MexAB-OprM ou MexXY-OprM étant beaucoup moins efficace (**Fig. 57**). Les quinolones non fluorées telles que l'acide nalidixique (**Fig. 57**) sont quant à elles préférentiellement exportées par la pompe MexEF-OprN, beaucoup moins par les pompes MexAB-OprM et MexCD-OprJ et très peu par la pompe MexXY-OprM (Köhler & al, 1997 ; Masuda & al, 2000). Ces résultats ont permis de conclure que la pompe MexCD-OprJ reconnaît spécifiquement les fluoroquinolones portant une charge positive et un atome de fluor, tandis que les quinolones dépourvues d'atome de fluor sont préférentiellement reconnues par la pompe MexEF-OprN.

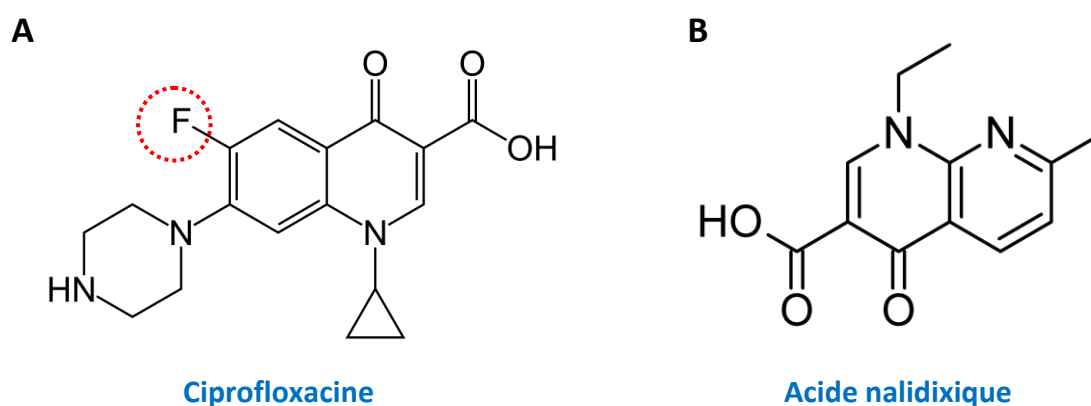
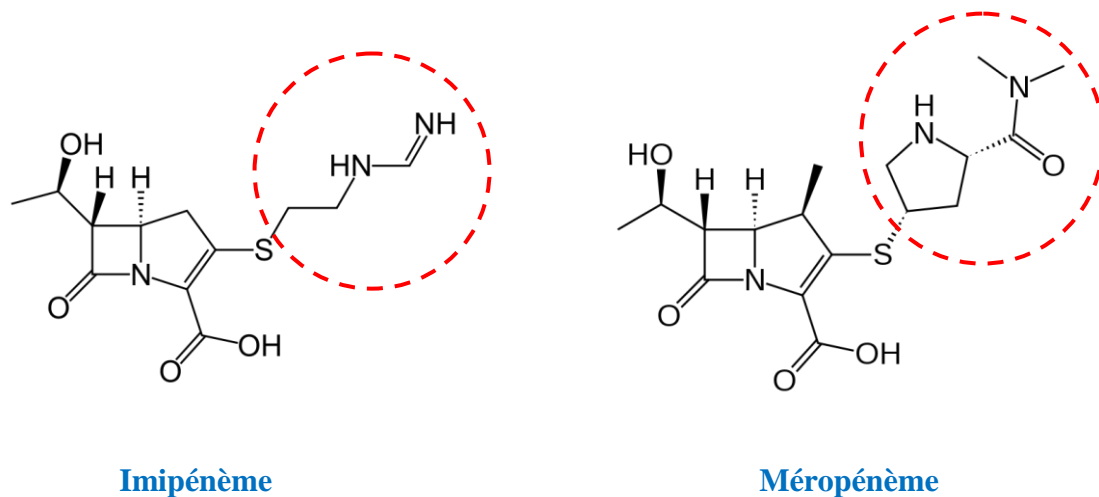


Figure 57 : Structures d'une quinolone fluorée (fluoroquinolone) (A) et d'une quinolone non fluorée (B). L'atome de fluor est encerclé en rouge.

Des études de l'efflux des β -lactamines, initialement réalisées avec AcrB chez *Salmonella Typhi* et transposées chez *P. aeruginosa* ont permis de montrer que le caractère hydrophobe de la chaîne latérale de ces antibiotiques constitue également un critère de sélection. Ces études ont permis de montrer que, plus la chaîne latérale est hydrophobe, plus l'antibiotique est susceptible d'être substrat des pompes (Masuda & al, 2000, 2001 ; Hocquet & al, 2006 ; Baum & al, 2009).

MexB transporte un large éventail de β -lactamines (pénicillines, carbapénèmes) mais l'imipénème n'est pas un substrat de la pompe. MexD a un spectre d'activité plus étroit et n'efflue aucun des substrats de MexB. MexY a un spectre encore plus étroit, excluant notamment la cefsulodine et l'aztréonam. Ces études ont permis de montrer que les substrats chargés négativement sont préférentiellement reconnus par MexB, mais pas par MexD ni par MexY. Le rôle des résidus chargés a été démontré grâce à des mutants de MexD présentant une capacité d'interaction avec des β -lactamines négativement chargées (ceftazidime, aztréonam). Les mutants Q45K et E89K présentent en effet une lysine additionnelle qui confèrent une résistance à ces antibiotiques (Mao & al, 2002) contrairement à la forme sauvage.

Ces études ont également permis de montrer que les pompes présentent une différence de spécificité pour les carbapénèmes suivant leur nature. Les pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM sont surexprimées chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* résistantes au méropénème, tandis que la sensibilité à l'imipénème demeure. La pompe MexEF-OprN n'est pas surexprimée et la pompe MexCD-OprJ est encore moins exprimée (Masuda & al, 2000 ; Ong & al, 2007 ; Castanheira & al, 2014). La différence réside essentiellement dans la nature et la flexibilité de la chaîne latérale, le méropénème ayant une chaîne latérale rigide et hydrophobe et la chaîne latérale de l'imipénème étant plus flexible et hydrophile (**Fig. 58**). Cette différence constitue donc un outil intéressant pour une étude comparative de l'interaction des pompes à efflux avec les carbapénèmes.



Imipénème

Méropénème

Figure 58 : Structures de deux carbapénèmes. L'imipénème présente une chaîne latérale hydrophile et flexible tandis que le méropénème présente une chaîne latérale rigide et hydrophobe.

Les mesures de CMI sont cependant dépendantes de la concentration minimale nécessaire pour activer un efflux maximal, ce qui complique les mesures chez *P. aeruginosa*, notamment à cause de sa faible perméabilité membranaire (voir § 2.2.1). Ceci limite l'accès des antibiotiques, élevant ainsi la CMI à des valeurs supérieures aux concentrations nécessaires pour tuer la bactérie (Dreier & Ruggerone, 2015). Dans ce cas, des inhibiteurs de l'efflux sont utilisés pour déterminer de façon rapide et précise si une molécule est un substrat des pompes ou pas. Les mesures de CMI en présence de phénylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) ou de carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) sont classiquement réalisées pour analyser l'effet de l'efflux. Le PA β N inhibe les pompes à efflux et perméabilise les membranes. La réduction de la CMI d'un antibiotique en présence de Pa β N indique que cet antibiotique est substrat de la pompe testée (Mesaros & al, 2007 ; Tran & al, 2009 ; Castanheira & al, 2014). Le CCCP est un inhibiteur indirect de l'activité d'efflux. Il dissipe la force protonotrice inhibant ainsi l'activité d'efflux des pompes de la famille RND. Il est utilisé de façon identique au PA β N. Ces tests de sensibilité permettent de déterminer de façon générale si une molécule est ou non substrat des pompes mais ils ne permettent cependant pas de déterminer les mécanismes d'interaction et d'efflux.

5.2. Etude de l'efflux *in vivo* et *in vitro*

Les études de transport par les pompes à efflux de la famille RND nécessitent la présence de trois compartiments (cytoplasme, périplasme et milieu extracellulaire). Chez la bactérie, ces compartiments existent naturellement. L'incubation des bactéries avec un antibiotique donné couplée à la mesure de la concentration de l'antibiotique au sein des différents compartiments permet d'évaluer l'activité d'efflux. Les compartiments cellulaires sont séparés par lyse des bactéries et filtration ou ultracentrifugation et analysés par spectrométrie de masse ou par chromatographie analytique. Certaines méthodes telles que la fluorescence sont cependant moins invasives et permettent d'évaluer l'efflux d'un antibiotique donné sans avoir recours à la séparation des compartiments cellulaires.

La fluorescence permet notamment d'observer l'accumulation des substrats à l'intérieur des bactéries et la variation de la fluorescence permet d'évaluer l'activité d'efflux d'une pompe donnée. Plusieurs protocoles utilisent des composés dont la capacité de fluorescence varie en fonction des changements environnementaux (Dreier & Ruggerone, 2015). C'est le cas du bromure d'éthidium (BET) qui est un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence augmente en cas d'insertion dans la double hélice d'ADN (Morita & al, 2001 ; Li & al, 2003). L'efflux actif de BET conduit donc à une diminution de la fluorescence liée à la diminution de la concentration intracellulaire de BET. D'autres fluorophores tels que le colorant Hoechst H33342 de la famille des bis-benzamides sont également utilisés pour évaluer l'efflux. Ce colorant est cependant peu efficace *in vivo* chez *P. aeruginosa* à cause de sa faible perméabilité membranaire et les tests sont réalisés à l'aide de pompes reconstituées chez *E. coli* (Welch & al, 2010). La doxorubicine, la pyronine Y et l'acriflavine sont également utilisées pour l'évaluation de l'efflux car leur fluorescence diminue ou disparaît complètement en cas d'internalisation (doxorubicine), de liaison à l'ARN (pyronine Y) ou de liaison à l'ADN (acriflavine) (Dreier & Ruggerone, 2015).

Des composés non fluorescents permettent également de suivre l'efflux grâce à leur conversion en fluorophores en fonction des changements environnementaux. C'est le cas de la résazurine bleue qui est convertie en résorufine rose fluorescente à l'intérieur des cellules, ou de l'alanine- β -naphthylamide (Ala-NAP) et de la leucine- β -naphthylamide (Leu-NAP) qui sont convertis en composés fluorescents à l'intérieur des cellules ou encore de la

fluorescéine-di- β -D-galactopyranoside (FDG) qui est hydrolysée en fluorescéine dans le cytoplasme d'*E. coli*. Ces composés ont été utilisés pour identifier ou développer des inhibiteurs des pompes à efflux tels que la méfloquine pour MexB et le PA β N. Certains de ces composés présentent cependant un inconvénient pour l'étude de l'efflux car ils sont substrats des pompes (c'est le cas de la résazurine qui est un substrat de MexB chez *P. aeruginosa* et d'AcrB chez *E. coli*), ils ne sont donc pas internalisés suffisamment longtemps pour être convertis. Ils sont cependant utilisés sous certaines conditions, par exemple dans des conditions dans lesquelles la bactérie ne pousse pas. Quant à la FDG, elle ne peut pas être utilisée chez *P. aeruginosa* car la bactérie ne peut pas l'hydrolyser. Elle a cependant été utilisée pour étudier l'efflux à travers les pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM de *P. aeruginosa* exprimées chez *E. coli* (Matsumoto & al, 2011) .

Des agents altérant l'intégrité des membranes tels que le colorant fluorescent *N*-phenyl-1-naphthylamine (NPN) ou la rhodamine sont également utilisés pour évaluer l'efflux. Le signal de fluorescence augmente en cas de déstabilisation de la membrane ou de changement de potentiel membranaire et le NPN a été décrit comme étant un substrat de MexB de *P. aeruginosa* et d'AcrB d'*E. coli* (Ocaktan & al 1997 ; Murakami & al, 2004). Ces différentes méthodes de quantification de l'efflux des substrats ont permis de caractériser l'interaction des pompes avec leurs substrats mais également d'étudier l'effet des inhibiteurs sur l'activité de la pompe ou encore d'identifier de nouveaux inhibiteurs des pompes (Morita & al, 2001). Morita et al, (Morita & al, 2003) ont notamment montré que l'efflux de BET n'est quantifiable qu'après induction de l'expression de la pompe MexCD-OprJ.

Ces différents composés peuvent également être utilisés *in vitro* pour quantifier l'efflux à travers les pompes grâce à des membranes artificielles reconstituées en vésicules (liposomes) au sein desquelles sont insérées les trois composantes des pompes à efflux de la famille RND (OMF, MFP et RND). La reconstitution de ces pompes couplée à des structures à haute résolution pourrait permettre de fournir des éléments de réponse quant à la stœchiométrie de la MFP qui reste un sujet de débat. La pompe MexAB-OprM fonctionnelle a été récemment reconstituée par Verchère et al (Verchère & al, 2013, 2014, 2015) grâce à des protéoliposomes contenant OprM et des protéoliposomes contenant MexA et MexB (**Fig. 59**). Ce système a permis de montrer l'efflux du BET à travers la pompe reconstituée,

grâce à un gradient de protons fourni par la bactériorhodopsine. La variation du pH couplée à la variation de fluorescence du BET a donc servi d'indicateur de transport. Ce système a également permis de montrer que le colorant Hoechst H33342 est un substrat de MexB et que MexA est requise pour la stimulation de l'activité d'efflux du transporteur. Un système similaire a permis de montrer l'importance de l'acylation de MexA dans l'assemblage de la pompe et dans l'activité d'efflux.

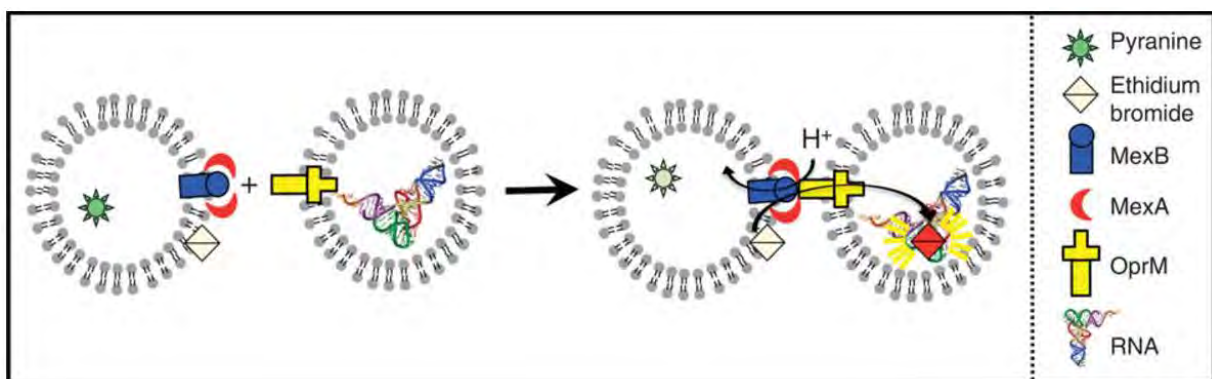


Figure 59 : Représentation schématique de l'efflux à travers la pompe assemblée *in vitro*. OprM (en jaune) est reconstituée dans des liposomes ayant encapsulé de l'ARN et MexA et MexB sont reconstituées ensemble au sein de liposomes ayant encapsulé de la pyranine. Les deux types de protéoliposomes sont incubés en présence de bromure d'éthidium (BET) et le transport est suivi grâce à la variation du pH couplée à la variation de la fluorescence du BET. (Adapté de Verchère & al, 2015, Nature Communications).

5.3. Etude des interactions au sein de la pompe

Les études d'interaction ont été majoritairement réalisées grâce à la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli*. Quelques données existent néanmoins concernant l'interaction au sein des pompes MexAB-OprM, MexXY-OprM, et MexEF-OprN de *P. aeruginosa*. Les études d'interaction portent sur l'interaction des pompes avec leurs substrats mais également sur l'interaction entre les différents partenaires des pompes. Elles ont été réalisées aussi bien par des approches biochimiques telles que l'ITC, la SPR, la fluorimétrie que par des

approches de microbiologie et de biologie moléculaire (mutagénèse dirigée, complémentation) ou encore par des approches structurales. La description faite ici n'est donc pas exhaustive.

5.3.1. Etude des interactions avec les substrats

Des études d'interaction ou de compétition d'AcrB en solution ou immobilisée sur une surface, avec des substrats fluorescents (rhodamine 6G, BET, proflavine) ou non (ciprofloxacine, novobiocine, PA β N) ont permis de montrer des différences d'affinité suivant la nature du substrat, mais également la présence de différents sites de fixation en fonction du type de substrat (Murakami & al, 2006 ; Su & al, 2007 ; Tikhonova & al, 2011 ; Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012). Ces études ont ainsi permis de confirmer la spécificité de l'interaction des pompes avec leurs substrats ou leurs inhibiteurs (Vargiu & Nikaido, 2012 ; Vargiu & al, 2014). Plusieurs molécules ont été décrites *in vivo* comme étant des substrats des pompes mais seules quelques-unes d'entre elles ont pu être cristallisées en complexe avec le transporteur (Murakami & al, 2006 ; Seeger & al, 2006 ; Sennhauser & al, 2007, 2009 ; Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012).

L'analyse de ces structures a permis de montrer l'importance des domaines de fixation des substrats (essentiellement localisées au niveau du domaine périplasmique, voir § 3.1.1.1 et 3.1.1.2) dans la spécificité d'interaction avec ceux-ci. Murakami et al ((Murakami & al, 2006) ont notamment montré que les substrats de faible poids moléculaire (doxorubicine, minocycline) se fixent préférentiellement au niveau de la poche distale de la crevasse tandis que Nakashima & al et Eicher et & al (Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012) ont montré que les substrats de haut poids moléculaire (érythromycine) se fixent préférentiellement au niveau de la poche proximale de la crevasse (voir § 3.1.1.2).

La permutation de gènes codant pour des boucles périplasmiques entre AcrB et AcrD chez *E. coli*, MexB et MexY chez *P. aeruginosa*, et AcrB d'*E. coli* et MexB de *P. aeruginosa* ont permis de montrer que la spécificité de reconnaissance du substrat est altérée (Elkins & Nikaido, 2002 ; Tikhonova & al, 2002 ; Eda & al, 2003, Wehmeier & al, 2009). Ces résultats

ont été confirmés par des expériences de mutagenèse dirigée au niveau des boucles périplasmiques de MexB et MexD (Mao & al, 2002 ; Middlemiss & Poole, 2004) ou de permutation de gènes entre MexB et MexY. Les mutations Q34K, E89K et N67K de MexD permettent l'efflux de β -lactamines chargées négativement, qui ne sont pourtant pas des substrats de la forme sauvage du transporteur, tandis que la permutation des domaines périplasmiques de MexB et MexY permet la reconnaissance et la fixation des β -lactamines anioniques qui ne sont pourtant pas substrats de MexY (Mao & al, 2002). Par ailleurs, les mutations des résidus D133 et Y613 de MexY affectent la résistance aux aminoglycosides (Lau & al, 2014).

Ces études ont par ailleurs permis de caractériser les voies d'entrée des substrats (Husain & al, 2011 ; Yao & al, 2013 ; Nakashima & al, 2013) ainsi que les poches de fixation, notamment la poche de fixation (poche hydrophobe comprise entre les domaines PC1 et PC2, voir § 4.1.1.2) des résidus à l'intérieur de la cavité distale d'AcrB d'*E. coli* et de MexB de *P. aeruginosa* (Murakami & al, 2006 ; Nakashima & al, 2011 ; Eicher & al, 2012). Un résidu Asparagine a notamment été identifié comme étant le résidu de la poche hydrophobe qui permet l'interaction avec les macrolides chez MexB de *P. aeruginosa* (Wehmeier & al, 2009). La permutation de gènes et des expériences de mutagenèse dirigée ont également permis de montrer que la spécificité d'une pompe est liée à la présence de résidus spécifiques au niveau des poches de fixation (Dreier & Ruggerone, 2015). On note la présence d'un tryptophane au niveau de la poche de fixation chez MexY, résidu qui est absent chez MexB et qui par conséquent ne peut pas contribuer à la spécificité de la pompe. Quatre résidus (Asp410, Ala411, Glu417 et Lys951) ont été identifiés par mutagenèse dirigée au niveau du domaine transmembranaire de MexF comme étant nécessaires à l'activité du transporteur. La mutation d'un cinquième résidu (Glu349) empêche l'efflux du triméthoprimine mais une activité partielle persiste en présence de chloramphénicol (Aires & al, 2002).

5.3.2. Etude des interactions entre les partenaires de la pompe

La spécificité de substrat est médiée par le transporteur RND. Des expériences de complémentation et de fluorescence ont permis de montrer que l'érythromycine, qui est un

substrat de la pompe MexCD-OprJ et qui n'est pas substrat de la pompe MexAB-OprM, est accumulé dans les cellules en présence de la pompe chimérique MexC-MexB-OprJ dans laquelle le transporteur MexD est remplacé par le transporteur MexB (Murata & al, 2002). Ces résultats sont corroborés par le fait que les pompes chimériques MexC-MexD-OprM et MexE-MexF-OprM au sein desquelles le canal OprM remplace respectivement OprJ et OprN, restaurent la résistance aux fluoroquinolones, qui sont des substrats des pompes MexE-MexF-OprN et MexC-MexD-OprJ mais pas à la ceftazidime et à l'aztréonam qui sont des substrats de la pompe MexA-MexB-OprM (Gotoh & al, 1998 ; Maseda & al, 2000).

Ces résultats montrent également le caractère versatile de certains canaux tels qu'OprM ou encore TolC d'*E. coli*. Ces canaux sont en effet capables de se substituer aux canaux de certaines pompes (OprN, OprJ) tout en conservant une pompe fonctionnelle (Srikumar & al, 1998 ; Maseda & al, 2000 ; Bokma & al, 2006). Cette caractéristique ne semble cependant pas être commune à toutes les OMFs car si OprJ se substitue à OprM au sein de la pompe MexAB, OprN ne se substitue pas à OprM, la pompe chimérique MexA-MexB-OprN n'étant pas fonctionnelle (Yoneyama & al, 1998 ; Maseda & al, 2000). Des mutants gain de fonction ont par ailleurs permis de montrer que l'extrémité C-terminale d'OprM est indispensable pour sa stabilité et l'assemblage au sein de la pompe (Bai & al, 2010 ; 2014).

Le rôle de la MFP dans l'assemblage a été décrit précédemment, des expériences de co-purification des constituants OMF, RND et MFP des pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM ont permis de montrer l'interaction entre le transporteur RND et la MFP est spécifique car MexX et OprM ne sont pas co-purifiés en présence de MexB, ce qui est également le cas pour MexA et OprM en présence de MexY. De plus, les pompes chimériques MexA-MexD-OprM et MexC-MexB-OprM ne sont pas fonctionnelles, ce qui va dans le sens des résultats précédents (Yoneyama & al, 1998 ; Mokhonov & al, 2004). Les résidus qui empêchent l'oligomérisation de MexA et son interaction avec MexB ont d'ailleurs été identifiés grâce à des expériences de mutagenèse dirigée (Nehme & al, 2004). Les gènes codant pour certaines pompes à efflux sont portés par des opérons dépourvus de gènes codant pour le canal OMF. Ces pompes, à l'instar de la pompe MexXY ou encore de la pompe MexJK recrute plusieurs transporteurs suivant la nature du substrat efflué (Jo & al, 2003 ; Chuanchuen & al, 2005).

=: : : : : : : : : : : : : : : :

L'implication des pompes à efflux de la famille RND dans l'augmentation sans cesse croissante de la résistance aux antibiotiques, en fait des cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles molécules permettant de restaurer l'efficacité des molécules thérapeutiques préexistantes. Plusieurs inhibiteurs de pompes d'efflux ont été développés mais ils présentent l'inconvénient d'être toxiques. Les données expérimentales liées à la structure et à l'activité de ces pompes restent cependant trop peu nombreuses pour pouvoir mettre en place les différentes stratégies visant à développer de nouveaux inhibiteurs, notamment des molécules capables de bloquer le canal OMF, de dissiper la force protomotrice, d'empêcher l'assemblage ou encore d'inhiber les pompes de façon compétitive. La compréhension des mécanismes qui régulent l'expression, l'assemblage et le fonctionnement des pompes mais également les interactions et les fonctions des composants OMF, RND et MFP au sein de la pompe tripartite permettront donc à terme de développer des inhibiteurs efficaces de l'activité de ces pompes à efflux. Nous nous sommes donc intéressés au cours de ce travail aux pompes à efflux de *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons notamment procédé à la caractérisation structurale du canal OprN de la pompe MexEF-OprN impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones et à la caractérisation du transporteur RND MexY de la pompe MexXY-OprM, spécifique des aminoglycosides. Nous avons étudié en parallèle le mécanisme d'ouverture du canal OprM seul *in vitro* (aspects structuraux) et *in vivo* (aspects fonctionnels) au sein de la pompe assemblée. Nous avons par ailleurs participé à l'étude *in vitro* de l'assemblage et du transport à travers la pompe MexAB-OprM, reconstituée au sein de protéoliposomes. En parallèle de l'étude des pompes à efflux, nous nous sommes intéressés à un autre système de résistance, impliqué dans la dégradation des antibiotiques. Nous avons donc réalisé, en collaboration avec le Pr Patrick Plésiat (laboratoire hospitalo-universitaire de Bactériologie de Besançon), la modélisation de mutants de la β -lactamase AmpC de *P. aeruginosa*.

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

1. Biologie Moléculaire

1.1. Souches utilisées

Trois types de souches bactériennes sont utilisés pour le clonage et l'expression des protéines recombinantes.

Les souches Top 10, Tuner et Stellar d'*Escherichia coli* disponibles au laboratoire, ont été sélectionnées pour leur efficacité de transformation et utilisées pour le clonage. Leurs caractéristiques sont résumées dans le **tableau 3**.

Souche	Souche d'origine	Organisme	Génotype	Utilisation	Référence
Stellar	HST08	<i>E. coli</i>	<i>F-</i> , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , $\Phi 80d$ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ -	Clonage	Clontech
Top 10	MC1061	<i>E. coli</i>	<i>F-</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) $\Phi 80$ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Clonage	Invitrogen
Tuner	BL21	<i>E. coli</i>	<i>F-</i> <i>ompT hsdSB (rB- mB-)</i> <i>gal dcm lacY1</i>	Clonage	Novagen
C43(DE3)	BL21(DE3)	<i>E. coli</i>	<i>F-</i> <i>ompT gal dcm hsdSB (rB- mB-)</i> <i>gal dcm (DE3)</i>	Expression	Miroux B. and Walker J.E., JMB 1996
C43(DE3) Δ <i>acrB</i>	C43(DE3)	<i>E. coli</i>	<i>F-</i> <i>ompT gal dcm hsdSB (rB- mB-)</i> (DE3), Δ <i>acrB</i>	Expression	Pr. Pos K. M. Goethe Universitat Frankfurt
PAO1wt	PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Souche sauvage prototrophe	Expression	(Stover et al 2000)
PAO1 Δ <i>oprM</i>	PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Δ <i>oprM</i>	Expression	Dr Llanes, université de Franche Conté Besançon

Tableau 3 : Récapitulatif des souches utilisées. Différentes souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées pour le clonage et l'expression des protéines recombinantes de *Pseudomonas aeruginosa*. Leur génotype ainsi que les souches dont elles sont dérivées sont indiquées. Deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisées pour les études fonctionnelles *in vivo*.

Les souches C43(DE3) et C43(DE3) Δ *acrB*, dérivées de la souche BL21(DE3) d'*Escherichia coli* ont été utilisées pour l'expression des protéines recombinantes. Ces souches contiennent des mutations sélectionnées de façon aléatoire par une stratégie d'évolution *in vitro* qui leur confèrent une tolérance aux protéines toxiques. Elles peuvent ainsi, grâce à une prolifération particulière d'un réseau de membranes intracellulaires, surexprimer les protéines, notamment les protéines de la membrane interne (Miroux and Walker, 1996 ; Arechaga & al, 2000). Une étude comparative récente des génomes de BL21(DE3), C41(DE3) et C43(DE3) met en évidence deux mutations ponctuelles, l'une dans le gène du répresseur *lacI* et l'autre dans le promoteur *lacUV5* de la région DE3, qui seraient à l'origine de la tolérance des souches C43(DE3) à l'expression des protéines membranaires toxiques (Kwon & al, 2015), ceci grâce à un ralentissement global du système de surexpression dépendant de l'ARN polymérase T7. La souche C43(DE3) Δ *acrB* présente la particularité d'être déléetée du gène codant pour le transporteur AcrB de la membrane interne d'*Escherichia coli*. La présence de deux histidines en C-terminal d'un monomère d'AcrB suffit à conférer une certaine affinité pour les résines chargées en nickel, ce qui en fait un contaminant bien connu des protéines de la membrane interne purifiées par cette approche (Veesler & al, 2008). La souche C43(DE3) Δ *acrB* permet donc de s'affranchir de cette contamination.

Les souches PAO1wt et PAO1 Δ *oprM* de *Pseudomonas aeruginosa*, qui nous ont été fournies par l'équipe du Pr Patrick PLESIAT du CHU de Besançon, ont été utilisées pour les expériences de complémentation *in vivo*. La souche PAO1 est l'une des souches sauvages de référence généralement utilisée pour les études fonctionnelles chez *Pseudomonas aeruginosa* et la souche PAO1 Δ *oprM*, dérivée de la souche PAO1 est déléetée du gène codant pour OprM, permettant l'étude fonctionnelle du canal par complémentation *in vivo*.

1.2. Plasmides utilisés

1.2.1. Expression des protéines recombinantes chez *E. coli*

1.2.1.1. Le vecteur d'expression pBAD33-GFPuv

Le vecteur pBAD33-GFPuv a été produit au laboratoire par le Dr. Houssain Benhabdelhak (**Fig.60A**). C'est un vecteur de 6113 bp résultant de l'insertion au sein du vecteur pBAD33 (Guzman, Belin, Carson, & Beckwith, 1995) d'un fragment de 1726 bp issu du vecteur pBAD-GFPuv (Cramer, Whitehorn, Tate, & Stemmer, 1996) après digestion par les enzymes de restriction PaeI et EcoRV. La présence du gène de la GFP permet un criblage visuel des clones positifs directement sur boîte de Pétri sous UV. L'expression des protéines s'effectue sous le contrôle du promoteur pBAD inductible au L-arabinose. Le vecteur porte également un gène de résistance au chloramphénicol, le gène CAT codant pour la chloramphénicol acétyltransférase, qui sert de marqueur de sélection. Lors de précédents clonages, le gène codant pour la GFP a été substitué après digestion par les enzymes de restriction NdeI et XmaI, les clones positifs n'exprimant plus la GFP ne seront donc pas fluorescents sous UV.

1.2.1.2. Les vecteurs d'expression pASK-IBA2 et pASK-IBA63

Les vecteurs pASK-IBA2 et pASK-IBA63 (IBA) sont des vecteurs de 3286 bp et 3326 bp respectivement, permettant l'expression de protéines recombinantes fusionnées à une étiquette Strep II (WSHPQFEK) au niveau de leur extrémité C-terminale. Les deux vecteurs portent un promoteur Tet inductible à l'anhydrotétracycline (AHT) et le vecteur pASK-IBA2 porte en plus la séquence signal de la porine OmpA (**Fig.60B**). Cette séquence permet l'adressage des protéines à la membrane interne et leur sécrétion dans le périplasme. La séquence signal est clivée au cours du processus de translocation. Les clones positifs sont sélectionnés grâce au gène de résistance à l'ampicilline porté par les deux vecteurs.

1.2.1.3. Le vecteur d'expression pET-11a

Le vecteur d'expression pET-11a (Novagen) est un vecteur de 5677 bp permettant l'expression des protéines recombinantes sous le contrôle du promoteur *T7* du bactériophage *T7* et de l'opéron lactose *LacO* inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (**Fig.60C**). Le vecteur porte le gène de résistance à l'ampicilline qui sert de marqueur de sélection.

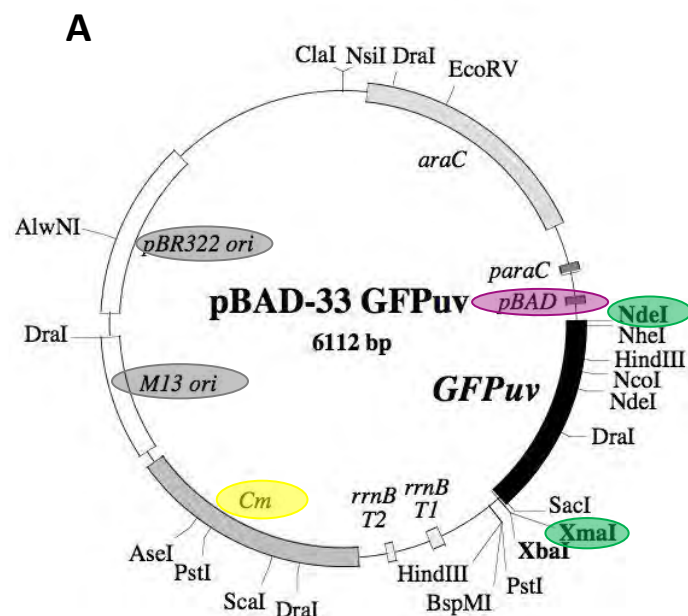
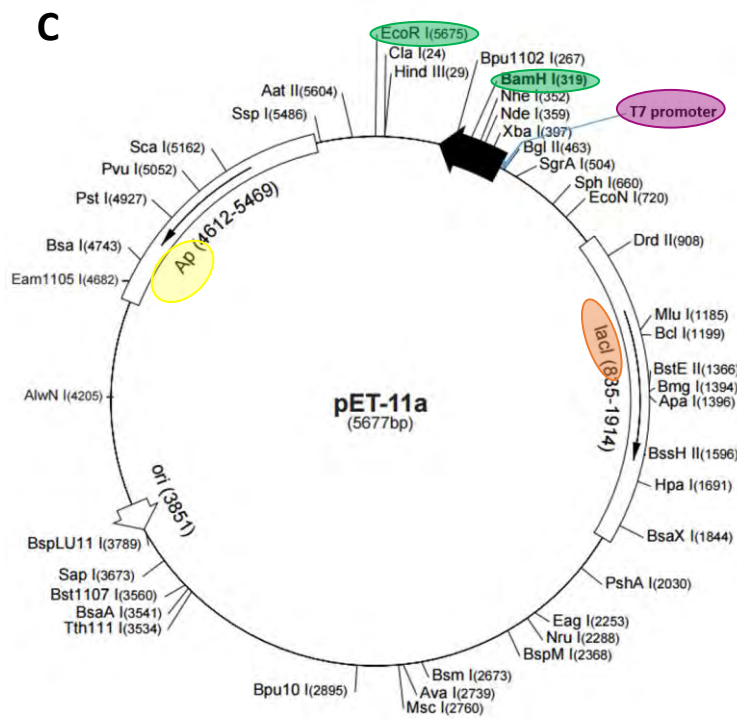
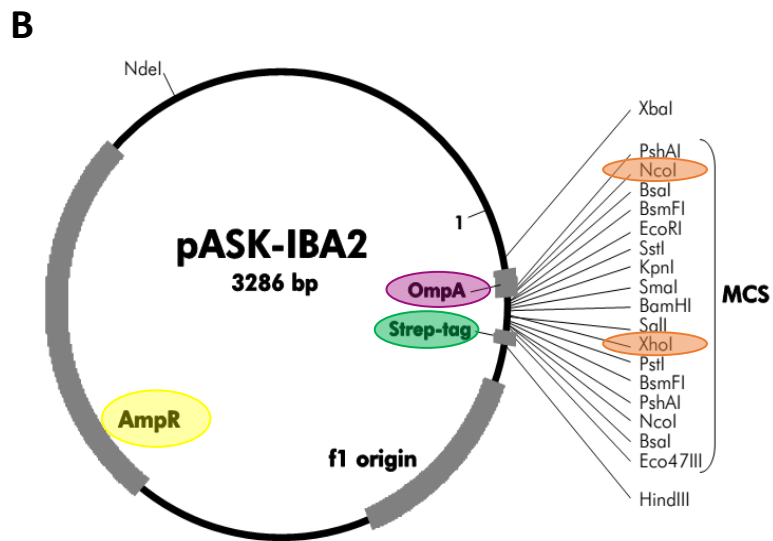


Figure 60 : Cartes des plasmides d'expression utilisés au cours des différents clonages. La carte C a été réalisée grâce à Addgene (banque de données des plasmides).

A) Carte du plasmide pBAD33-GFPuv. Le promoteur pBAD est surligné en rose. Le gène d'intérêt est inséré entre les sites de restriction NdeI et XmaI (surlignés en vert) situés de part et d'autre du gène codant pour la GFP. Les origines de réplication M13 et pBR322 sont surlignées en gris et le gène de résistance au chloramphénicol (CAT) en jaune.

B) Carte du plasmide pASK-IBA2. Le vecteur porte un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) surligné en jaune et une étiquette Strep II (WSHPQFEK) surlignée en vert. Il porte également la séquence signal de la porine OmpA surlignée en rose et le gène d'intérêt est inséré entre les sites de restriction NcoI et XhoI.

C) Carte du plasmide pET-11a. L'expression s'effectue sous le contrôle du promoteur *T7* (surligné en rose) et de l'opéron Lactose *LacI* (surligné en orange). Le gène de résistance à l'ampicilline est surligné en jaune et les sites de restriction utilisés pour le clonage (EcoRI et BamHI) sont surlignés en vert.



1.2.2. Complémentation *in vivo* chez *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.2.1. Le vecteur d'expression pME6001

Les études fonctionnelles *in vivo* chez *Pseudomonas aeruginosa* nécessitent une expression stable des protéines et donc le maintien des plasmides. Le vecteur pME6001 (**Fig.61**), qui nous a été fourni par l'équipe du Pr Patrick PLESIAT du CHU de Besançon, est un vecteur navette de 7425 bp (Blumer, Heeb, Pessi, & Haas, 1999) optimisé pour une utilisation compatible avec le clonage et l'expression aussi bien chez *E. coli* que chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il porte trois promoteurs, les promoteurs *Lac* et *T3* en amont du site multiple de clonage et le promoteur *T7* en aval. Dans notre contexte, l'expression s'effectue sous le contrôle des promoteurs *Lac* et *T3*. Le vecteur porte un gène de résistance à la gentamicine, le gène *aacC1* codant pour la gentamicine acétyltransférase.

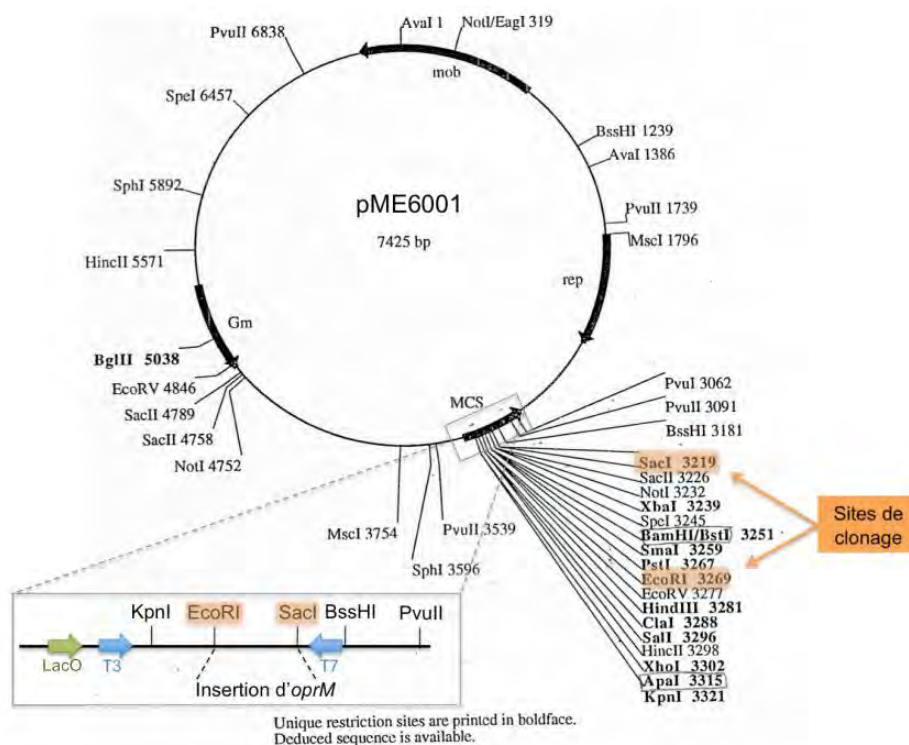


Figure 61 : Carte du plasmide pME6001. Le vecteur porte trois promoteurs : les promoteurs *Lac* et *T3* indiqués par les flèches bleue et verte en amont du site multiple de clonage (MCS) et le promoteur *T7* représenté par la flèche bleue en aval du MCS. Il porte également un gène de résistance à la gentamicine (Gm). Les sites de clonage (EcoRI et SacI) sont surlignés en orange.

1.2.2.2. Le vecteur d'expression pUCP24

Le vecteur pME6001 présentant une surexpression basale des protéines étudiées, le vecteur pUCP24, qui nous a également été fourni par l'équipe du Pr Patrick PLESIAT de Besançon, est apparu comme une meilleure alternative permettant d'obtenir un taux d'expression physiologique. Dérivé du vecteur pUCP18 (West, Schweizer, Dall, Sample, & Runyen-Janecky, 1994), le vecteur pUCP24 (**Fig.62**) est un vecteur de 4036 bp présentant l'avantage d'avoir un promoteur unique plus faible que ceux du vecteur pME6001, le promoteur *Lac*. C'est un vecteur multicopies de plus petite taille, qui présente un site multiple de clonage (MCS) versatile. Il porte le même gène de résistance à la gentamicine que le vecteur PME6001.

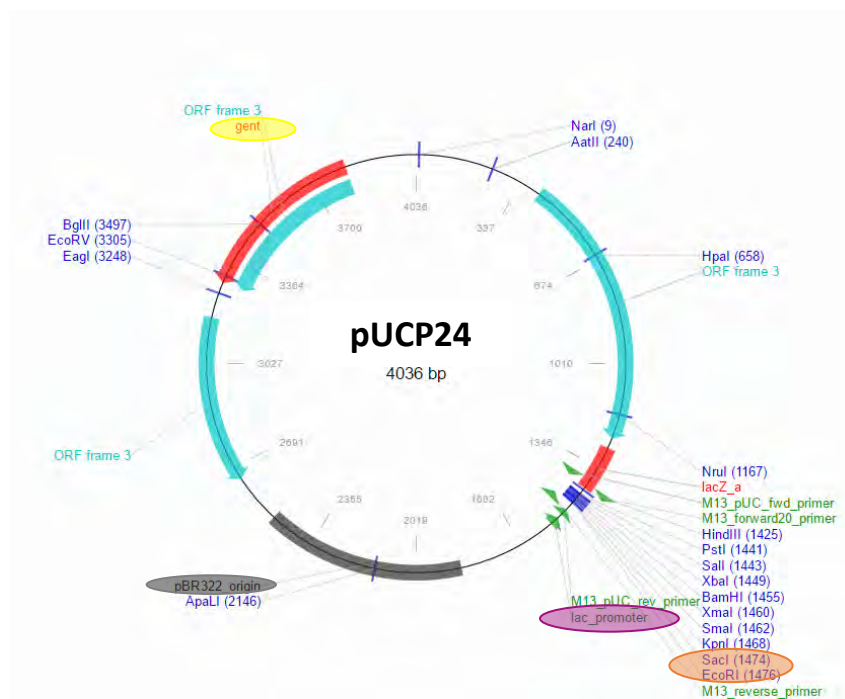


Figure 62 : Carte du plasmide pUCP24. La carte a été réalisée à partir d'Addgene. L'expression s'effectue sous le contrôle du promoteur *Lac* surligné en rose et le vecteur porte le gène de résistance à la gentamicine surligné en jaune. L'origine de réplication pBR322 est surlignée en gris et les sites de restriction utilisés pour le clonage (*EcoRI* et *SacI*) sont surlignés en orange.

1.3. Clonage des gènes OprM, MexX et MexY dans des vecteurs d'expression

1.3.1. Clonage du mutant ouvert d'OprM dans le vecteur d'expression pBAD33-GFPuv

1.3.1.1. Amplification des inserts à partir du vecteur pME6001

Dans le but d'étudier le mécanisme d'ouverture du canal OprM, un mutant d'OprM comportant quatre mutations, R403L, Y404F, D416A et R419A, choisies pour l'éventuelle implication de ces résidus dans le maintien de la conformation fermée d'OprM, a été cloné par la plateforme IMAGIF à Gif-sur-Yvette à partir du plasmide pME6001-OprM-R403L-Y404F comportant les deux premières mutations et des amorces OprM-416-419-Fwd et OprM-416-419-Rev (Thèse de L. Monlezun, Université Paris Descartes, 2012). Ce mutant, nommé pME6001-OprM-Quad-mut par soucis de simplicité, a servi de matrice pour l'amplification de l'insert par PCR, dont les conditions expérimentales sont résumées dans les **tableaux 4 et 5**.

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volume
Matrice ADN	100 ng/μL	2 ng	1 μL
Amorce 5'	20 μM	0,4 μM	1 μL
Amorce 3'	20 μM	0,4 μM	1 μL
dNTPs	10 mM	200 μM	1 μL
Tampon <i>Phusion</i>	10x	1x	5 μL
<i>Phusion</i> DNA Pol	100x	2x	1 μL
H ₂ O	-	-	qsp 50 μL

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel

Etapes	Température (°C)	Durée	Nb de cycles
Dénaturation initiale	98	30 s	1
Dénaturation	98	10 s	30
Hybridation	58	30 s	
Elongation (≈ 1 min/kb)	72	2 min	
Elongation finale	72	5 min	1

Tableau 5 : Programme de PCR utilisé pour les Clonages

Les amorces OprM-5'-NdeI et OprM-3'-HisXmaI (voir **Tableau 6**, fin du § **1.3.4**) ont été utilisées pour les réactions d'amplification réalisées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler® pro (Eppendorf) avec une ADN polymérase produite au laboratoire (*Phusion*). Ces amorces permettent la digestion ultérieure du produit d'amplification par les enzymes de restriction NdeI et XmaI grâce à l'insertion de sites de coupure de part et d'autre du gène à amplifier. L'amorce 3' permet d'insérer une étiquette poly-histidine (6 histidines) au niveau de l'extrémité C-terminale.

Le séquençage après criblage des clones positifs a cependant révélé la délétion de la thymine 13, décalant ainsi le cadre de lecture et conduisant à un défaut d'expression. Ce produit de PCR ayant été très difficile à obtenir, nous avons choisi d'y insérer directement le nucléotide manquant à l'aide du couple d'amorces OprM-5'-T13 et OprM-3'-T13 suivant les conditions expérimentales décrites dans les **tableaux 4 et 5**, plutôt que de tout recommencer une nouvelle fois.

1.3.1.2. Digestion, ligation et transformation

Toutes les enzymes de restriction utilisées proviennent de New England Biolabs.

Le produit d'amplification d'une taille de 1496 bp est traité par l'enzyme de restriction DpnI à 37 °C pendant 1 h. L'enzyme DpnI clive l'ADN parental méthylé. Elle est inactivée par chauffage à 80 °C pendant 20 min. L'insert est ensuite digéré par les enzymes de restriction NdeI et XmaI pendant 1 h à 37 °C. Les enzymes sont inactivées à 65 °C pendant 20 min. Le produit de digestion est ensuite purifié sur gel à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur, puis inséré dans le vecteur pBAD33-GFPuv préalablement digéré par les mêmes enzymes. La ligation est effectuée dans un rapport vecteur/insert 1 : 3 (w/w) par la T4 DNA ligase pendant une nuit à 16°C. 5 µL de produit de ligation sont utilisés pour transformer des bactéries chimiocompétentes de la souche Top 10 d'*E. coli* par choc thermique. La suspension bactérienne est étalée sur une boîte LBC (boîte LB contenant du chloramphénicol à 25 µg/mL) après 45 min d'incubation à 37 °C. Les boîtes sont incubées sur la nuit dans une étuve à 37 °C.

1.3.1.3. Criblage des clones positifs

Une PCR sur colonies est réalisée suivant les conditions décrites en **1.3.1.1** à l'aide des amorces utilisées pour le clonage. Les colonies apparues sur boîte LBC sont utilisées comme matrice. Afin de purifier les plasmides recombinants, une préculture de 10 mL est réalisée à 37 °C sous agitation (200 rpm) pendant une nuit en milieu LB additionné de chloramphénicol à 25 µg/mL à partir des clones positifs. Les plasmides sont purifiés l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur et séquencés avant leur utilisation pour la production. Le plasmide obtenu contenant le gène du quadruple mutant d'OprM est nommé pBAD33-OprM-4mut.

1.3.2. Clonage des gènes *MexX* et *MexY* dans les vecteurs d'expression pASK-IBA63 et pASK-IBA2

En vue de caractérisations structurale et biochimique, les séquences codantes des gènes *mexX* et *mexY* ont été amplifiés à partir du plasmide pAGH97 contenant l'opéron *mexXY* (Aires & al, 1999) grâce aux amorces *MexX*-5'-NcoI et *MexX*-3'-XhoI pour *MexX* et *MexY*-5'-BsaI et *MexY*-3'-BsaI pour *MexY*. Les gènes sont amplifiés par PCR comme décrit précédemment (§1.3.1.1) et une étiquette Strep II (WSHPQFEK) est insérée au niveau de l'extrémité C-terminale pour la purification ultérieure des protéines sur résine Strep-Tactin®. La séquence d'adressage *ompA* est insérée au niveau de l'extrémité N-terminale de *MexY* afin de favoriser le bon adressage à la membrane. Elle est clivée au cours de la translocation.

Les inserts amplifiés sont digérés par la DpnI comme décrit précédemment (§1.3.1.2) puis pendant 1 h à 37 °C par les enzymes NcoI et XhoI pour *MexX* et BsaI pour *MexY* et insérés respectivement dans les vecteurs pASK-IBA63 et pASK-IBA2 préalablement digérés par les mêmes enzymes. Les étapes allant de la ligation au criblage sont effectuées suivant les conditions décrites précédemment (§1.3.1.2 et §1.3.1.3), les bactéries utilisées pour la transformation étant des bactéries chimiocompétentes de la souche Tuner d'*E. coli*. Par contre, la sélection des clones est effectuée sur boîtes LBA (boîtes LB contenant de

l'ampicilline à 100 µg/mL) car les vecteurs pASK-IBA63 et pASK-IBA2 portent une résistance à l'ampicilline. Les constructions obtenues sont nommées pIBA63-MexX pour MexX et pIBA2-MexY pour MexY.

1.3.3. Clonage de MexY dans le vecteur d'expression pET-11a

La surexpression du transporteur MexY présente un problème de toxicité pour la bactérie. La production de la protéine sous forme soluble s'étant avérée infructueuse avec l'utilisation du vecteur pASK-IBA2, nous avons décidé de changer de stratégie et de passer à la co-expression de MexY avec son partenaire périsplasmique MexX. Un plasmide d'expression bicistronique nous a été fourni par le Pr. T. Nakae (Université de Kitasato, Japon). Il s'agit du vecteur pET11a, contenant un opéron synthétique constitué en amont de MexX, et en aval de MexY. Le vecteur a été obtenu suivant le protocole décrit par **Mokhonova et al. 2005** après plusieurs étapes de PCR résumées par la **figure 63**.

Les deux gènes ont tout d'abord été amplifiés indépendamment. Le gène *mexX* a été amplifié à partir d'un plasmide dans lequel il est fusionné en N-terminal à la séquence signal de son homologue AcrA d'*E. coli* (AcrAleader). Le gène *mexY* a quant à lui été amplifié à partir du génome de la souche PAO4090 de *Pseudomonas aeruginosa* avec la séquence canonique Shine-Dalgarno (SD) insérée en amont du gène à la place de sa séquence SD native et une étiquette poly-histidine (6 histidines) insérée en C-terminal. Les produits d'amplification sont ensuite insérés dans le vecteur pBluescript II SK+, générant ainsi deux constructions intermédiaires nommées pBS-AcrAleader-MexX pour MexX et pBS-MexY^{his} pour MexY. Le fragment MexY est extrait par digestion de la construction pBS-MexY^{his} et inséré dans le plasmide pBS-AcrAleader-MexX, permettant d'obtenir la construction pBS-AcrAleader-MexX-MexY. Le vecteur bicistronique final pMexXY^{his} est obtenu par insertion du produit de digestion du plasmide pBS-AcrAleader-MexX-MexY dans le vecteur pET-11a.

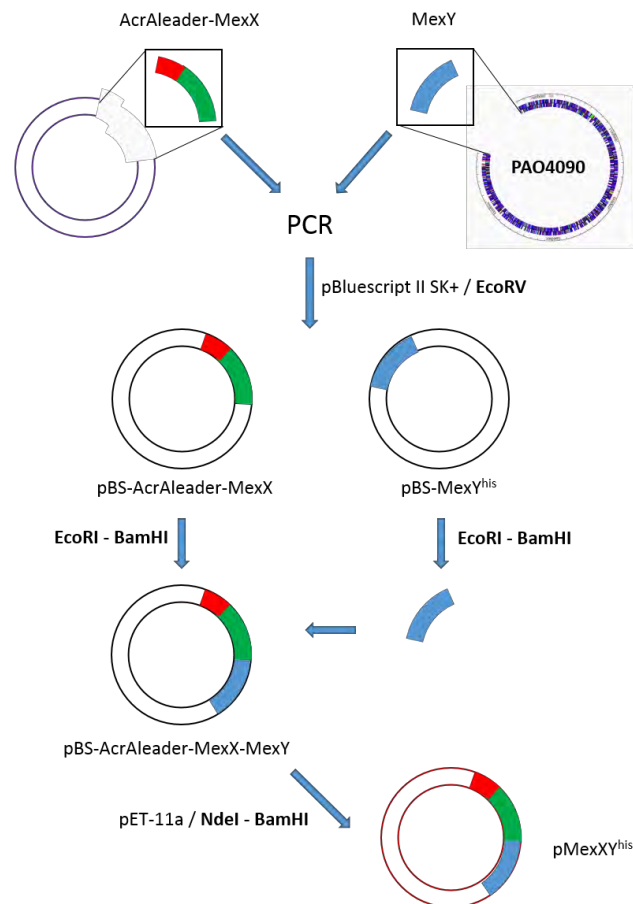


Figure 63 : Résumé de la procédure de clonage utilisée pour MexY dans le vecteur pET-11a (adapté de Mokhonova et al. 2005). La séquence correspondant à la séquence signal d'AcrA (AcrAleader) est représentée en rouge, celle correspondant à MexX en vert et la séquence correspondant à MexY en bleu. Les trois vecteurs utilisés pour le clonage sont représentés en violet pour le plasmide AcrAleader-MexX, en noir pour le pBluescript II SK+ et en rouge pour le pET-11a. Les enzymes de restriction utilisées pour le clonage sont indiquées en gras.

1.3.4. Clonage d'OprM et de ses mutants dans le vecteur pUCP24

Certains résidus supposés impliqués dans l'ouverture périplasmique du canal OprM ont été mutés et sept mutants ont été générés : quatre mutants simples (R403L, Y404F, D416A, R419A), deux mutants doubles (R403L-Y404F et D416A-R419A) et le quadruple mutant décrit en 1.3.1.1 (R403L-Y404F-D416A-R419A). Ces versions mutées du gène *oprM* ont été clonées dans le vecteur pME6001, vecteur navette compatible avec une expression stable des protéines chez *Pseudomonas aeruginosa* pour réaliser des études fonctionnelles

par complémentation *in vivo* (Thèse de L. Monlezun, Université Paris Descartes, 2012). Ce vecteur présente cependant l'inconvénient de surexprimer les protéines étudiées de façon basale. Nous avons donc choisi de re-cloner les gènes codant pour les formes sauvage et mutée d'OprM dans un vecteur ayant un promoteur plus faible, le pUCP24 afin de réduire l'expression des protéines à un taux physiologique. Les deux vecteurs nous ont été fournis par l'équipe du Pr Patrick PLESIAT du CHU de Besançon. Les inserts correspondants aux différentes versions du gène *oprM* sont amplifiés par PCR à partir des plasmides dérivés du pME6001 (pME6001-OprM-XXXX) grâce aux amorces OprM-pseudo-5'-EcoRI et OprM-pseudo-3'-Sacl suivant le protocole décrit en **1.3.1.1**. L'amorce 3' permet l'insertion d'une étiquette poly-histidine utilisée ultérieurement pour la détection des protéines par western blot.

Les produits d'amplification sont digérés par la DpnI comme décrit précédemment (§**1.3.1.2**) puis pendant 1 h à 37 °C par les enzymes de restriction EcoRI HF et SacI HF. Les produits de digestion sont insérés dans le vecteur pUCP24 préalablement digéré par les mêmes enzymes, suivant les conditions décrites au paragraphe **1.3.1.2**. La transformation et le criblage des clones positifs sont effectués comme décrit précédemment (§**1.3.1.2** et §**1.3.1.3**), exception faite de la transformation qui est réalisée à l'aide de bactéries chimiocompétentes de la souche Stellar d'*E. coli* et de la sélection des clones recombinants qui est effectuée sur boîte LBG (boîte LB contenant de la gentamicine à 15 µg/mL).

Le protocole décrit en **1.3.1.1** n'a cependant pas permis d'obtenir de produit d'amplification. Nous avons voulu nous affranchir de l'éventuelle dégradation des réactifs en renouvelant les stocks de réactifs et de plasmides. Nous avons également augmenté la concentration de la matrice ainsi que la durée de l'élongation mais nos essais sont demeurés infructueux. Nous avons finalement réussi à amplifier les inserts en changeant de polymérase et en ajoutant du DMSO au mélange réactionnel. La *Phusion* (produite au laboratoire) qui est pourtant 50 fois plus fidèle (4×10^{-7} erreurs/bp, comparativement à la Taq polymérase) et plus processive, a été remplacée par la *pfu* (également produite au laboratoire) qui est certes moins fidèle ($1-2 \times 10^{-6}$ erreurs/bp, comparativement à la Taq polymérase) et 10 fois moins processive que la *Phusion*, mais qui reste plus thermostable (elle conserve 95% de son activité jusqu'à plus de 2 heures d'incubation à 95 °C) (McInerney, & al, 2014).

D'autre part, le génome de *Pseudomonas aeruginosa* est riche en GC, ce qui constitue une difficulté supplémentaire pour les clonages, favorisant la formation de structures secondaires, et nécessitant des températures de fusion plus élevées. L'addition de DMSO permet de dénaturer les matrices riches en GC. Il abaisse également la T_m des amorces, ce qui permet d'éviter la formation de structures secondaires (dimères d'amorces). Enfin, il favorise la dénaturation des structures superenroulées, rendant ainsi le plasmide plus accessible à la polymérase.

8 nouveaux plasmides ont ainsi été obtenus : pUCP24-OprM-wt, pUCP24-OprM-R403L, pUCP24-OprM-Y404F, pUCP24-OprM-D416A, pUCP24-OprM-R419A, pUCP24-OprM-R403L-Y404F, pUCP24-OprM-D416A-R419A et pUCP24-OprM-4mut. Le plasmide pUCP24-OprM-D416A présentait cependant une insertion de 18 nucléotides (18-ins) en amont de l'étiquette poly-histidine. L'insert a donc été de nouveau amplifié suivant le protocole optimisé décrit plus haut grâce au plasmide pUCP24-OprM-D416A utilisé comme matrice et au couple d'amorces OprM-pseudo-5'-EcoRI et OprM-pseudo-3'-SacI-his. La seconde amorce s'hybride de part et d'autre de l'insertion 18-ins, sur l'extrémité C-terminale du gène d'OprM d'une part, et sur l'étiquette poly-histidine d'autre part, permettant d'ôter l'insertion 18-ins non désirée.

Ces plasmides ont été utilisés pour transformer des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* électrocompétentes, en vue des expériences de complémentation *in vivo*.

Protéine	Amorces	Séquence (5' -> 3')	Tm (°C)	%GC	bp
OprM	OprM-5'-NdeI	GGAATTC CATATGAAACGGTCCTTCCTTCC	71	45,1	31
	OprM-3'-HisXmaI	TCCCCCGGGTCA GTGATGGTATGGTATGAGCCTGGGGATCTCC TCTTCGCGGTCTG	76	60,6	61
	OprM-5'-T13	TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAACGGTCCTTCC*	74,4	32,6	46
	OprM-3'-T13	AGCGGCTACCGCCAGGGAAGGAAGGACCGTTTCATATGTATATCT	81,6	50	46
	OprM-pseudo-5'-EcoRI	GAAGTCCG GAAATCATGAAACGGTCCTTCCTTCC	75,4	48,6	35
	OprM-pseudo-3'-Sacl	AGCGACC GAGCTCGGTCAGTGATGGTATGGTG	78,9	60,6	33
	OprM-pseudo-3'-Sacl-His	TAT GAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGAGCCTGGGGATCTTCCT TCTT	72,6	54,9	51
MexX	MexX-5'-NcoI	GGAGATATAC CCATGGATGCACATCCAATGGACCGG	76,6	51,4	35
	MexX-3'-XhoI	CCAAGCGCT CTCGAGCTGGCCCGCCGGCGAGGCGG	88,3	80	35
MexY	MexY-5'-BsaI	NNNNNN GGTCTCNGGCCGCTCGTTCTTCATCGACCGTCCA	-	-	41
	MexY-3'-BsaI	NNNNNN GGTCTCNGCGCTGGCTGTTCGGTCCGGAATCTGCGG	-	-	42

Tableau 6 : Récapitulatif des amorces utilisées. Les sites de coupure des enzymes de restriction sont indiqués en bleu, l'étiquette poly-histidine est indiquée en rouge, la séquence de l'amorce s'hybridant sur le gène d'intérêt est indiquée en gras et soulignée, les codons correspondant aux résidus mutés sont indiqués en gras et en minuscule. La Thymine 13 est indiquée par un *. La lettre N correspond à l'une des quatre bases azotées.

Plasmides	Description	Inducteur	Résistance	Référence
pBAD33-GFPuv	Vecteur d'expression dérivé du pBAD33 et du pBAD-GFP, 6613 bp	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Benhabdelhak
pPMM ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>OprM</i> ^{his}	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Monlezun
pBAD33-OprM-2mut ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations D416A et R419A	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Benhabdelhak
pBAD33-OprM-4mut ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations R403L, Y404F, D416A et R419A	L-arabinose	Cm ^R	Cette étude
pPMN ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>OprN</i> ^{his}	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Benhabdelhak
pPMA ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>MexA</i> ^{his}	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Benhabdelhak
pPME ^{his}	Vecteur dérivé du pBAD33-GFPuv portant le gène <i>MexE</i> ^{his}	L-arabinose	Cm ^R	LCRB, Benhabdelhak
pET-22b-MexB ^{his}	Vecteur d'expression dérivé du pET-22b portant le gène <i>MexB</i> ^{his}	IPTG	Amp ^R	LCRB, DEZI
pASK-IBA63	Vecteur d'expression, 3226 bp	AHT	Amp ^R	IBA
pIBA63-MexX ^{strep}	Vecteur dérivé du pASK-IBA2 portant le gène <i>MexX</i> ^{strep}	AHT	Amp ^R	Cette étude
pASK-IBA2	Vecteur d'expression, 3286 bp	AHT	Amp ^R	IBA
pIBA2-MexY ^{his}	Vecteur dérivé du pASK-IBA2 portant le gène <i>MexY</i> ^{strep}	AHT	Amp ^R	Cette étude
pMexXY ^{his}	Vecteur dérivé du pET-11a portant l'opéron synthétique constitué de <i>MexX</i> et de <i>MexY</i> ^{his}	IPTG	Amp ^R	(Mokhonova et al., 2005)
pME6001	Vecteur de clonage et d'expression dérivé du vecteur pME6000 compatible avec <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> , 7425 bp	-	Gm ^R	(Blumer et al., 1999)
pME6001- OprM- wt ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his}	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- R403L ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation R403L	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- Y404F ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation Y404F	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- D416A ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation D416A	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- R419A ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation R419A	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- R403L- Y404F ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations R403L et Y404F	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- D416A- R419A ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations D416A et R419A	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pME6001- OprM- 4mut ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations R403L, Y404F, D416A et R419A	-	Gm ^R	Plateforme IMAGIF
pME6001- OprN ^{his}	Vecteur dérivé du pME6001 portant le gène <i>OprN</i> ^{his}	-	Gm ^R	LCRB, Monlezun
pUCP24	Vecteur de clonage et d'expression multicopies dérivé du vecteur pUCP18 compatible avec <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> , 4036 bp	-	Gm ^R	(West et al., 1994)
pUCP24- OprM- wt ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his}	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- R403L ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation R403L	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- Y404F ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation Y404F	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- D416A ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation D416A	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- R419A ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec la mutation R419A	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- R403L- Y404F ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations R403L et Y404F	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- D416A- R419A ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations D416A et R419A	-	Gm ^R	Cette étude
pUCP24- OprM- 4mut ^{his}	Vecteur dérivé du pUCP24 portant le gène <i>OprM</i> ^{his} avec les mutations R403L, Y404F, D416A et R419A	-	Gm ^R	Cette étude

Tableau 7 : Récapitulatif des plasmides utilisés

2. Expression des protéines recombinantes chez *E. coli*

2.1. Production des protéines recombinantes

2.1.1. Production des protéines OMF (OprM-2mut, OprM-4mut et OprN)

Les plasmides recombinants (pBAD33-OprM-2mut, pBAD33-OprM-4mut et pPMN) ont été utilisés pour transformer des bactéries chimiocompétentes de la souche C43(DE3) $\Delta acrB$ d'*E. coli* par choc thermique. Les clones positifs sont sélectionnés sur boîte LBC et un clone isolé sur boîte a été utilisé pour ensemercer une préculture de 200 mL de LB (Luria-Bertani) contenant du chloramphénicol à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final. La préculture, incubée à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant une nuit, est utilisée pour ensemercer un litre de milieu additionné de chloramphénicol à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final, à une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.05$.

15 L de culture dans du TB (Terrific Broth) et 6 L de culture dans du LB ont été réalisés pour produire respectivement les mutants d'OprM et OprN en quantités suffisantes pour des utilisations ultérieures. Les cultures sont incubées à 37 °C sous agitation à 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,2$ pour les mutants d'OprM et d'une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6$ pour OprN. La culture est ensuite refroidie pendant 30 min à 4°C et l'expression des protéines est induite à 18 °C par addition de L-arabinose à une concentration finale de 0,02 % (w/v). La culture se poursuit sur la nuit à 18 °C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 8 000 g pendant 30 min à 18 °C puis les culots sont repris dans du tampon de lyse (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM). Les culots peuvent être conservés à -80 °C pour une utilisation ultérieure après congélation dans l'azote liquide.

2.1.2. Production des protéines MFP (MexA, MexX et MexE)

Des bactéries chimiocompétentes de la souche C43(DE3) d'*E. coli* ont été transformées à l'aide des plasmides recombinants pPMA, pIBA63-MexX et pPME. Les clones positifs sont sélectionnés et isolés sur boîte LBC pour MexA et MexE et LBA pour MexX. Les

précultures et les cultures sont réalisées comme décrit en **2.1.1** avec addition de chloramphénicol à 25 µg/mL final pour MexA et MexE et d'ampicilline à 100 µg/mL final pour MexX. Toutes les cultures sont réalisées dans 6 L de LB. L'expression des protéines est induite comme décrit en **2.1.1** par addition de L-arabinose à une concentration finale de 0,02 % (w/v) pour MexA et MexE et d'anhydrotétracycline (AHT) à une concentration finale de 0,2 µg/mL pour MexX. Les bactéries sont centrifugées comme décrit précédemment et le culot est repris dans le tampon de lyse (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 200 mM).

2.1.3. Production des protéines RND (MexB et MexY)

Des clones positifs, obtenus à partir de bactéries chimiocompétentes de la souche C43(DE3) Δ *acrB* d'*E. coli* transformées par les plasmides pET-22b-MexB, pIBA2-MexY et pMexXY ont été sélectionnés sur boîte LBA. Les clones isolés sont utilisés pour ensemercer des précultures réalisées comme décrit en **2.1.1** avec addition d'ampicilline à 100 µg/mL final. Les cultures sont réalisées dans 6 L de LB comme précédemment avec addition d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pour MexB et MexY (pMexXY) à une concentration finale de 1 mM et d'anhydrotétracycline (AHT) pour MexY (pIBA2-MexY) à une concentration finale de 0,2 µg/mL pour l'induction de l'expression des protéines. Les culots bactériens obtenus après centrifugation sont repris dans du tampon de lyse (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 200 mM).

2.2. Purification des protéines recombinantes

2.2.1. Purification des protéines OMF (OprM-2mut, OprM-4mut et OprN)

Les culots obtenus précédemment sont lysés à haute pression à l'aide d'un broyeur cellulaire (Cell-Disruptor, Constant LTD), à 4 °C après deux passages à 2,4 kbar. Le lysat obtenu est centrifugé à 8 000 g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est prélevé et

ultracentrifugé à 145 000 g pendant 1 h à 4 °C afin de récupérer la fraction correspondant aux membranes totales. Le culot peut être conservé à -80 °C pour une utilisation ultérieure après congélation dans l'azote liquide. Une nouvelle étape d'ultracentrifugation peut être réalisée après resuspension du culot dans du Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM afin de laver les membranes. Le culot obtenu est repris dans 100 mL du même tampon et incubé sous agitation douce pendant 15 min à température ambiante avec du N-Lauryl Sarcosine à une concentration finale de 0,5 % (w/v). Ce détergent permet de séparer la membrane externe de la membrane interne car il solubilise préférentiellement la membrane interne d'*E. coli* (Filip, Fletcher, Wulff, & Earhart, 1973).

Une ultracentrifugation à 145 000 g est ensuite réalisée pendant 1 h à 4 °C afin de récupérer un culot correspondant à la membrane externe. Le culot est repris dans 10 mL de tampon de solubilisation (tampon S, voir **tableau 8** pour la composition des tampons) et un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma) est réalisé afin de déterminer la quantité de protéines dans les membranes. La solubilisation est ensuite réalisée à une concentration finale de 1-5 mg/mL de protéines. Les membranes sont solubilisées par addition de n-dodécyl- β -D-maltoside (DDM) à une concentration finale de 1,5 % (w/v) au tampon S, pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. La solubilisation s'effectue **sans glycérol** pour OprN car elle précipite en présence de glycérol. Le lendemain, la solution est ultracentrifugée à 145 000 g pendant 45 min à 4 °C et le surnageant, correspondant à la fraction de membranes externes solubilisées, est chargé à l'aide d'une pompe péristaltique sur une colonne de nickel (résine NiNTA sépharose, His Trap HP®, GE Healthcare) de 5 mL préalablement équilibrée avec le tampon A, en circuit fermé sur la nuit à 4 °C et sous agitation douce, ceci à cause du volume important de solution à passer sur la colonne.

N.B. : Tous les tampons utilisés sont préparés sans glycérol pour OprN.

Une fois les protéines fixées sur la résine, la colonne est lavée en plusieurs étapes avec des tampons à concentrations croissantes en imidazole. Le premier lavage est réalisé avec un volume correspondant à 10 fois le volume de colonne (10 CV) de tampon A (20 mM d'imidazole). À cette étape, l'échange de détergents peut être effectué. En effet, les OMF (OprM, OprN) peuvent être purifiées aussi bien en DDM qu'en Octyl- β -Glucoside (β OG), un autre détergent non ionique. La purification des protéines s'effectuera dans l'un ou l'autre

des détergents suivant l'utilisation ultérieure prévue. Elle se fera préférentiellement en β OG pour la cristallisation. Dans le cas d'un échange de détergent, la colonne est ensuite lavée avec 10 CV de tampon A'. Les lavages suivants sont réalisés avec 6 CV, par ajout progressif du tampon d'élution (5 %, 10 % et 15 % du tampon B ou B') au tampon A (ou A') afin d'augmenter progressivement la concentration en imidazole (44 mM, 68 mM et 92 mM). Les protéines sont éluées avec 2CV de tampon B ou B' (500 mM d'imidazole).

Les fractions collectées sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE 10 % (w/v) avec un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 180 kDa), Thermo Scientific) et la forme sauvage d'OprM précédemment purifiée servant de référence. Les fractions éluées (contrairement aux autres fractions) ainsi que la forme sauvage d'OprM servant de référence ne sont pas chauffées avant le dépôt sur gel afin de préserver la forme trimérique d'OprM (ou d'OprN) (\approx 150 kDa).

Une étape de protéolyse ménagée est ensuite réalisée à température ambiante pour les échantillons destinés à la cristallisation, en présence de trypsine dans un ratio protéase/protéine 1 : 100 (w/w) pendant 1 h. Les fractions éluées (protéolysées ou non) sont concentrées par centrifugation à 4 000 g à 4 °C à l'aide d'un concentrateur (Amicon Ultra, Millipore) d'un cut-off de 100 kDa avant de subir une dernière étape de purification par gel filtration. Après une ultime étape de centrifugation d'une minute à 11 000 g à 4°C pour se débarrasser d'éventuels agrégats, l'échantillon concentré est injecté sur une colonne Superose 6® préparative de 120 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon C (ou C'), afin de se débarrasser de l'imidazole et d'éventuels contaminants. Les protéines sont éluées dans le tampon C (ou C'). Les fractions éluées sont concentrées comme décrit précédemment et utilisées immédiatement après purification pour la cristallisation ou congelées dans de l'azote liquide et conservées à -60 °C pour une utilisation ultérieure.

Réactif	Tampon S	Tampon A	Tampon A'	Tampon B	Tampon B'	Tampon C	Tampon C'
Tris –HCl, pH 8	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM
DDM (w/v)	1,5 %	0,05 %	-	0,05 %	-	0,05 %	-
βOG (w/v)	-	-	0,9 %	-	0,9 %	-	0,9 %
Imidazole	-	20 mM	20 mM	500 mM	500 mM	-	-
Glycérol (v/v)	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %

Tableau 8 : Composition des tampons utilisés au cours des différentes étapes de purification des OMF.

2.2.2. Purification des protéines MFP (MexA, MexX et MexE)

Les culots sont lysés comme décrit précédemment (§2.2.1) et centrifugés pendant 25 min à 10 000 g à 4 °C. Le surnageant de lyse est ensuite ultracentrifugé 1 à 2 fois à 145 000 g pendant 1 h à 4°C. Le culot contenant les membranes totales est repris dans 10 mL de tampon de solubilisation (tampon S1 pour MexA et MexE et tampon S' pour MexX, voir **tableau 9** pour la composition des tampons) et la solubilisation est réalisée comme décrit précédemment (§2.2.1). Toutes les étapes de purification sont réalisées en DDM et la première étape sur colonne de nickel est réalisée comme décrit précédemment (§2.2.1) pour MexA et MexE. Quant à MexX, elle porte une étiquette Strep, elle est donc purifiée sur résine Strep-tactin sépharose (Strep Trap® HP, GE Healthcare). La colonne est équilibrée avec le tampon A dépourvu d'imidazole (tampon A_S) et le lavage (10 CV) est effectué avec le même tampon. Les protéines sont éluées avec le tampon A_S additionné de desthiobiotine à une concentration finale de 2,5 mM (Tampon A_SD).

Les fractions éluées (MexA, MexE et MexX) sont analysées sur gel 12 % (w/v) et concentrées par centrifugation à l'aide d'un concentrateur possédant un cut-off de 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Après une ultime étape de gel filtration, toutes les protéines, éluées dans le tampon C sont à nouveau concentrées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -60 °C.

Réactif	Tampon S1	Tampon S'	Tampon A	Tampon B	Tampon A _S	Tampon A _S D	Tampon C
Tris –HCl, pH 8	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	200 mM	200 mM	150 mM	150 mM	200 mM	200 mM	200 mM
DDM (w/v)	1,5 %	1,5 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %
Desthiobiotine	-	-	-	-	-	2,5 mM	-
Imidazole	20 mM	-	20 mM	500 mM	-	-	-
Glycérol (v/v)	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %

Tableau 9 : Composition des tampons utilisés au cours des différentes étapes de purification des MFP.

2.2.3. Purification des protéines RND (MexB et MexY)

Le gène codant pour le transporteur MexY ayant été cloné dans le vecteur pASK-IBA2, la protéine porte une étiquette Strep II. Les étapes de lyse et de purification sont par conséquent réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites pour MexX. Cependant, la production de la protéine sous forme agrégée nous a poussés à changer de vecteur et la protéine est désormais produite à l'aide du vecteur pET-11a qui lui confère une étiquette poly-histidine. Les étapes de lyse et de purification de MexY (pET11-a) et de MexB sont par conséquent identiques à celles décrites pour MexA et MexE et les fractions sont analysées sur gel 10% (w/v). Les protéines éluées de gel filtration sont concentrées à l'aide d'un concentrateur avec un cut-off de 100 kDa et conservées à -60 °C après congélation à l'azote liquide.

3. Cristallogénèse et Cristallographie

3.1. Cristallogénèse et cristallisation des protéines OMF

Le défi principal des études structurales de protéines, notamment de protéines membranaires par cristallographie aux rayons X réside dans l'obtention de cristaux à fort pouvoir diffractant à partir d'échantillons purs et homogènes. Dans le cas des protéines membranaires, une difficulté supplémentaire réside dans la quantité de protéines produites, la cristallographie étant une technique nécessitant de grandes quantités de protéines et les protéines membranaires étant produites avec un faible rendement.

Les premiers essais de cristallisation ont été réalisés sur la base des conditions de cristallisation de la forme sauvage d'OprM (Phan et al., 2010). Les conditions de cristallisation ont par la suite été optimisées en traitant les échantillons par protéolyse ménagée par la trypsine (voir §2.2.1) ou par protéolyse *in situ* (addition de trypsine dans la goutte de cristallisation) afin de se débarrasser des régions flexibles et d'obtenir des cristaux possédant un meilleur pouvoir de diffraction.

Comme préambule à la cristallisation, les protéines, préalablement traitées ou non par protéolyse à la trypsine, ont été concentrées à respectivement 5 mg/mL et 6 mg/mL pour OprM-2mut et OprM-4mut, 10 mg/mL (forme non protéolysée) et 12 mg/mL (forme protéolysée) pour OprN, dans un tampon contenant 0,9 % de β OG. Les essais de cristallisation ont été réalisés uniquement avec les formes protéolysées des deux mutants d'OprM et avec les deux formes d'OprN (protéolysée et non protéolysée), en faisant varier la concentration de la forme protéolysée.

Le criblage des conditions de cristallisation est réalisé grâce à un automate (Mosquito[®] Crystal, TTP Labtech) (**Fig.64**), à l'aide des kits commerciaux *MemGold*TM (MD1-39), *MemGold2*TM (MD1-63) et *MemStart*TM/*MemSys*TM HT-96 (MD1-21 et MD1-25) (Molecular Dimensions). Le robot Mosquito[®] permet de travailler sur des nanovolumes d'échantillons, réduisant ainsi les quantités de protéine utilisée, ce qui permet la miniaturisation des tests. Il permet également la réalisation de gouttes assises ou suspendues (**Fig.64**) pour des expériences de cristallisation par la technique de diffusion de vapeur ou de gouttes sous huile. Dans notre contexte, les cristaux ont été obtenus par la

méthode de diffusion de vapeur en goutte assise à l'aide de boîtes *Mosquito*[®] (TTP Labtech) de 96 puits disposant de 3 cupules de dépôt par puits. Les gouttes ont été réalisées avec 0,1-0,2 μL de protéine pour 0,1-0,2 μL de solution de cristallisation (ratio 1 : 1 (v/v)) avec 40 μL de solution de cristallisation dans le réservoir et les boîtes sont conservées à 18 °C.

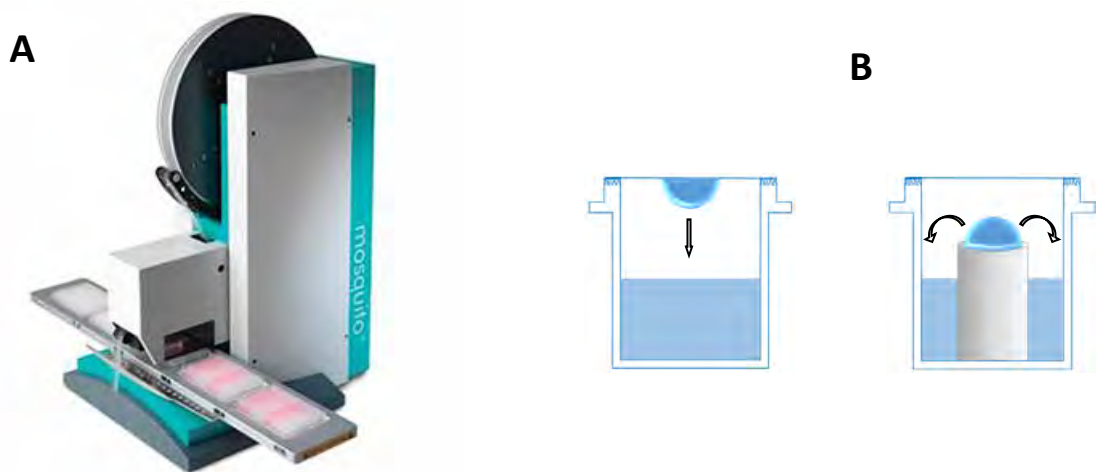


Figure 64 : Outils et techniques utilisés pour le criblage des conditions de cristallisation. a) Robot de cristallisation *Mosquito*[®] (TTP Labtech). b) Technique de cristallisation par diffusion de vapeur, à gauche par goutte suspendue, et à droite par goutte assise. Les flèches indiquent l'échange d'eau entre la goutte et le réservoir.

Plusieurs cristaux sont obtenus au bout d'une semaine dans plusieurs conditions pour le mutant *OprM-4mut* ainsi que pour *OprN*, cristallisée sous ses deux formes (protéolysée et non protéolysée). Les cristaux correspondant au mutant *OprM-2mut* sont quant à eux obtenus au bout d'un peu plus d'un mois. Les différentes pistes de cristallisation obtenues ont ensuite été optimisées en modifiant différents paramètres tels que la concentration en agents précipitants, la concentration en sels et le pH. Les gouttes sont réalisées manuellement à l'aide de boîtes *Linbro*[®] de 24 puits avec 1,5 μL de protéine pour 1,5 μL de solution de cristallisation (ratio 1 : 1 (v/v)) et 500 μL de solution de cristallisation dans le réservoir. Les protéines sont cristallisées cette fois en employant la méthode de diffusion de

vapeur en goutte suspendue. 4 conditions parmi celles obtenues en boîtes Mosquito® ont été optimisées pour OprM-4mut et 4 pour OprN, ce qui a nécessité 54 et 96 essais respectivement. Les tests ont été réalisés uniquement avec la forme protéolysée. Les cristaux d'OprM-4mut sont directement stabilisés par ajout dans la solution de cristallisation de PEG400 à 30 % (v/v) ou de glycérol (22 - 25 % (v/v)) afin de les protéger de la cryo-congélation. Pour OprN, 25 % de glycérol sont ajoutés dans la goutte comme cryo-protectant au moment de la congélation des cristaux dans de l'azote liquide à 100 K.

3.2. Cristallographie

3.2.1. Structures des mutants d'OprM : Collecte et traitement des données, construction du modèle et validation de la structure

Malgré de nombreux essais d'optimisation, aucun jeu de données n'a pu être collecté à ce jour pour le mutant OprM-2mut, les cristaux étant de trop petite taille pour être exploités. Seules quelques taches ont pu être enregistrées à 16Å de résolution, montrant qu'il s'agit bien de cristaux de protéine. Concernant le mutant OprM-4mut, plusieurs cristaux issus des différentes conditions reproduites manuellement ont été analysés sur la ligne de lumière PX1 du synchrotron SOLEIL. Le jeu de données possédant la plus haute résolution (2,84 Å) a été enregistré à partir de 1 800 images collectées à une longueur d'onde de 0,97857 Å avec un pas d'oscillation de 0,1 °. Les différents jeux de données ont été traités à l'aide de programmes de la suite CCP4i (Winn et al., 2011). La réduction des données, l'indexation et l'intégration ont été réalisées à l'aide du programme *iMOSFLM* et la mise à l'échelle à l'aide du programme *SCALA*.

La structure cristallographique du mutant OprM-4mut a été résolue par la méthode de remplacement moléculaire à l'aide du programme *PHASER* (McCoy et al., 2007). Le modèle utilisé pour le remplacement moléculaire correspond à l'une des structures résolues de la forme sauvage d'OprM (code PDB **3D5K**, Phan et al. 2010) au sein de laquelle sont

introduites les quatre mutations R403L, Y404F, D416A et R419A à l'aide du logiciel *MacPyMOL* (DeLano Scientific LLC).

L'affinement de la structure obtenue a été réalisé à l'aide du programme *REFMAC* (Murshudov, Vagin, and Dodson 1997, Murshudov et al. 2011) associé au programme de construction *COOT* (Emsley and Cowtan 2004, P. Emsley et al. 2010). La qualité des statistiques d'affinement ainsi que celle de la géométrie de la structure ont été vérifiées à l'aide de modules de validation du programme de construction *COOT* et du programme de validation de structure en ligne *MolProbity* (Chen et al., 2010).

3.2.2. Structure d'OprN : collecte et traitement des données, construction du modèle et validation de la structure

Plusieurs jeux de données de diffraction ont été enregistrés sur la ligne de lumière ID-23-2 (ESRF, Grenoble), à partir de cristaux optimisés manuellement. Le jeu de données possédant la plus haute résolution (2,3 Å) a été enregistré à partir de 2560 images collectées à une longueur d'onde de 0,873 Å avec un pas d'oscillation de 0,05 °. L'indexation, l'intégration et la mise à l'échelle ont été réalisées comme décrit en **3.2.1**.

La structure cristallographique d'OprN a été résolue comme décrit précédemment (§3.2.1). Le modèle utilisé pour le remplacement moléculaire a été construit à l'aide du programme *BALBES* de la suite *CCP4i* en utilisant la séquence d'OprN et l'une des structures de la forme sauvage de son homologue structural OprM comme modèle (code PDB **3D5K**, Phan et al. 2010). Après aplatissage de solvant, le programme *ARP/wARP* (Lamzin 1993, Victor S. Lamzin and Wilson 1997) a positionné les molécules d'eau, mais il n'a pas réussi à reconstruire le domaine équatorial. Le reste de la chaîne a donc été reconstruit manuellement à l'aide du programme *COOT*. L'extrémité N-terminale a été reconstruite en se basant sur une des structures d'OprM (code PDB **4Y1K**, Monlezun et al. 2015).

L'affinement de la structure obtenue a été réalisé comme décrit précédemment (§3.2.1) et la qualité des statistiques d'affinement ainsi que celle de la géométrie de la structure ont été vérifiées comme décrit précédemment (§3.2.1).

4. Modélisation de mutants cliniques de la β -lactamase AmpC

Plusieurs mutations de la β -lactamase AmpC ont été identifiées chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes aux pénicillines et aux céphalosporines. Une recherche par homologie de séquence (BLAST), réalisée sur la base des données structurales de la PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) partir de la séquence d'AmpC de *P. aeruginosa* (<http://www.pseudomonas.com/>) a permis d'obtenir 43 structures de protéines homologues. Afin de localiser les résidus mutés et d'évaluer leurs effets sur la résistance, les structures présentant une β -lactamase en complexe avec une molécule au sein de son site actif ont été sélectionnées et superposées à la structure de la β -lactamase AmpC de *P. aeruginosa* (code PDB **2WZZ**). Les mutations et la modélisation des mutants ont été réalisées avec le programme *MacPyMOL* (DeLano Scientific LLC).

5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* par complémentation *in vivo*

5.1. Antibiogramme : principe, intérêt et applications

Le profil de sensibilité d'une bactérie pathogène vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques permet d'orienter le choix de la thérapie et du dosage, ainsi que les combinaisons adéquates d'antibiotiques en fonction de la résistance intrinsèque du pathogène. Ce profil est déterminé en mettant le pathogène au contact de différents antibiotiques normalement efficaces grâce à la réalisation d'antibiogrammes. Ce test microbiologique, très utilisé en milieu clinique est réalisé en solution ou par diffusion en milieu gélosé et permet, en plus de guider le choix du praticien, d'identifier les bactéries en fonction de leurs résistances naturelles et d'assurer une surveillance épidémiologique de l'émergence de résistances acquises.

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (technique utilisée dans notre contexte), est réalisé à l'aide d'antibiotiques présentés sous différents conditionnements :

- ✚ imprégné sur un disque de papier déposé à la surface de la gélose préalablement ensemencée. L'efficacité de chaque antibiotique est évaluée en mesurant les diamètres d'inhibition autour des disques.
- ✚ en solution de concentration connue, la solution étant mélangée à la solution d'agar avant gélification. L'efficacité de chaque antibiotique est évaluée en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), i.e. la plus faible concentration d'antibiotiques capable de provoquer une inhibition complète de la croissance bactérienne.
- ✚ imprégné sur une bandelette de papier graduée, selon un gradient de concentration (E-test, Biomérieux) déposé à la surface de la gélose préalablement ensemencée. Les graduations de la bandelette permettent de déterminer une CMI, qui est la valeur correspondant à l'ellipse d'inhibition.

La fiabilité des résultats (antibiogramme et CMI) doit être rigoureusement évaluée. Ces méthodes microbiologiques font l'objet d'une standardisation et l'interprétation des

résultats est régie par des recommandations aussi bien au niveau national par le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) qu'européen par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Le choix des antibiotiques testés est effectué sur la base des traitements couramment utilisés contre la bactérie pathogène. Le CA-SFM fournit des tables répertoriant d'une part, les antibiotiques appropriés pour les tests en fonction du pathogène (aussi bien ceux testés en routine que ceux utilisés en complément) ainsi que la concentration de l'antibiotique sur les disques (charge des disques, en µg), et d'autre part des concentrations critiques permettant d'évaluer la sensibilité du pathogène vis-à-vis d'un antibiotique donné (cible).

Les recommandations 2015 du CA-SFM pour *Pseudomonas aeruginosa*, regroupant des β-lactamines, des aminoglycosides et des fluoroquinolones, sont résumées dans le **tableau 10** et l'interprétation des valeurs (CMI et diamètre d'inhibition) est décrite par la **Figure 65**.

Antibiotiques	CMI (mg/L)		Charge du disque	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Cible	Limites acceptables		Cible	Limites acceptables
Amikacine	2	1-4	30	22	18-26
Aztréonam	4	2-8	30	26	23-29
Céfépime	1-2	0,5-4	30	27	24-30
Ceftazidime	2	1-4	10	24	21-27
Ciprofloxacine	0,5	0,25-1	5	29	25-33
Colistine	1-2	0,5-4	-	-	-
Doripénème	0,25	0,12-0,5	10	32	28-35
Fosfomycine	4	2-8	-	-	-
Gentamicine	1	0,5-2	10	20	17-23
Imipénème	2	1-4	10	24	20-28
Lévofloxacine	1-2	0,5-4	5	23	19-26
Méropénème	0,5	0,25-1	10	30	27-33
Netilmicine	2	0,5-8	10	18	15-21
Pipéracilline	2-4	1-8	-	-	-
Pipéracilline-tazobactam	2/4-4/4	1/4-8/4	30/6	26	23-29
Ticarilline	16	8-32	-	-	-
Ticarilline-acide clavulanique	16/2	8/2-32/2	75/10	24	20-28
Tobramycine	0,5	0,25-1	10	23	20-26

Tableau 10 : Recommandations 2015 du CA-SFM pour *Pseudomonas aeruginosa*.

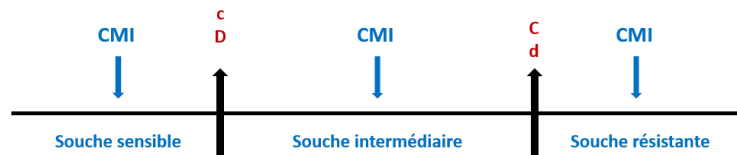


Figure 65 : Interprétation des valeurs de CMI et des diamètres d'inhibition. C et c correspondent aux valeurs limites de CMI et D et d aux valeurs limites des diamètres d'inhibition, permettant de classer les souches. La souche sera considérée comme sensible si $CMI < c$ et diamètre d'inhibition $> D$, intermédiaire si $c < CMI < C$ et $d < Diamètre < D$ et résistante si $CMI > C$ et diamètre $< d$.

5.2. En pratique...

5.2.1. Préparation des bactéries électrocompétentes

Contrairement à *E. coli*, les bactéries électrocompétentes de *P. aeruginosa* ne se conservent et doivent être préparées extemporanément et transformées dans la foulée.

À partir d'une préculture de la souche de *P. aeruginosa* d'intérêt, réalisée à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant la nuit, 50 mL de milieu MH sont inoculés au 1/50^{ème} et incubés à 37°C, sous agitation jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600nm} = 0,7$. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 15 min à 4 500 g et le culot obtenu est repris sous agitation douce dans un ½ volume (25 mL) de sucrose stérile (300 mM). Les bactéries sont à nouveau centrifugées comme précédemment. Un second lavage est réalisé dans les mêmes conditions et le culot est repris dans 1/100 de volume (500 µL) de sucrose stérile (300 mM). Des aliquots de 100 µL sont réalisés et les bactéries sont immédiatement transformées.

5.2.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de bactéries *P. aeruginosa* électrocompétentes de la souche PAO1 $\Delta oprM$, transformées par électroporation à l'aide d'un électroporateur Micropulseur (Biorad) (1 pulse à 2,5 kV) avec des vecteurs recombinants de type pUCP24-

OprM-XXXX ou pME6001-OprM-XXXX. Un clone de chaque souche, sélectionné sur boîte LBG, a été utilisé pour réaliser une préculture de 10 mL de MH (Mueller-Hinton, Sigma) sans antibiotique pendant 16-18 h à 37 °C sous agitation (200 rpm). Cette préculture est utilisée pour ensemercer une culture de 10 mL de MH sans antibiotique à une $DO_{600nm} = 0,06$. La culture est incubée pendant 1 h à 37 °C sous agitation (200 rpm) jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600nm} \approx 0,12$ soit 0,5 McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). Un contrôle est réalisé en parallèle avec des cultures témoins des souches PAO1wt et PAO1 $\Delta oprM$, mais également avec la souche PAO1 $\Delta oprM$ transformée avec le vecteur sans insert, réalisées dans les mêmes conditions.

5.2.3. Réalisation des antibiogrammes

Toutes les séries d'antibiogrammes réalisées à partir des différentes méthodes ont été reproduites trois fois.

5.2.3.1. Par diffusion en milieu gélosé à l'aide de disques imprégnés

55 mL de gélose MH (Mueller-Hinton agar, Sigma) préalablement coulée sur une boîte de Pétri carrée (15x15 mm) ont été ensemençés par inondation à l'aide d'une suspension de chaque souche réalisée comme décrit en 5.2.1 et diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau stérile, soit un volume final de 10 mL. Les suspensions ont par la suite été diluées au 1/100^{ème}, à cause de la présence d'un double halo d'inhibition, qui peut être dû à un inoculum trop concentré. Les boîtes sont séchées pendant 10 min à l'étuve à 37 °C et recouvertes de disques imprégnés d'antibiotiques (Antimicrobial susceptibility disks, Biorad) à l'aide d'un distributeur d'antibiotiques (16-disk Dispenser, Biorad) (**Fig.66**). 16 antibiotiques sont testés (résumés par le **Tableau 11**) et les boîtes sont incubées à 37 °C. Une comparaison de la valeur des diamètres d'inhibition, mesurés après 18 à 24h de culture, avec les valeurs de référence du CA-SFM permet d'évaluer la sensibilité de la souche pour l'antibiotique considéré. Plus le diamètre d'inhibition est grand et plus la souche est sensible à l'antibiotique.



Figure 66 : Dispenseur d'antibiotiques (16-disk Dispenser, Biorad), à gauche et répartition des disques d'antibiotiques sur la gélose, à droite.

Antibiotiques	Famille
	β-Lactamines
Céfotaxime	Céphalosporines (3 ^{ème} génération)
Ceftazidime	
Pipéracilline (+/- Tazobactam)	Pénicillines
Ticarcilline (+/- Ac clavulanique)	
Céfépime	Céphalosporine (4^{ème} génération)
Aztréonam	Monobactame
Méropénème	Carbapénèmes
Imipénème	
Amikacine	Aminoglycosides
Gentamicine	
Kanamycine	
Tobramycine	
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone
Colistine	Polymyxine

Tableau 11 : Liste des antibiotiques testés.

5.2.3.2. Par dilution en milieu gélosé

Un gradient de concentration est réalisé à l'aide de 25 mL de gélose MH (Mueller-Hinton agar, Sigma) contenant des concentrations décroissantes d'un même antibiotique, obtenues par dilution en série deux par deux. La gélose est coulée sur des boîtes de Pétri rondes (\varnothing 90 mm) et 8 antibiotiques (Sigma) sont testés. Une suspension est réalisée comme décrit précédemment (§5.2.1) avec une dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau stérile, soit un volume final de 5 mL. 200 μ L de suspension de chaque souche sont répartis sur une microplaque 96 puits et chaque boîte de gélose estensemencée de façon homogène avec l'ensemble des suspensions à l'aide d'un ensemencateur de Steers (Multipontelite™ SCAN 4 000, Mast Diagnostic) (**Fig.67**). Les boîtes sont incubées à 37 °C et analysées au bout de 18-24 h. La plus faible concentration (et donc la première boîte de gélose) à laquelle la souche ne pousse plus correspond à la CMI.

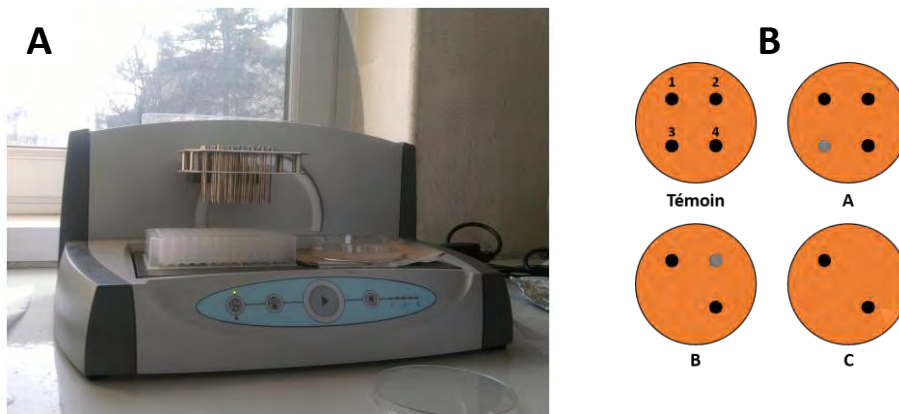


Figure 67 : Ensemencateur de Steers (a). AntibioGramme par dilution en milieu gélosé (b). Les points noirs représentent des colonies bactériennes. La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antibiotique incorporé dans la gélose correspond à la concentration B.

5.2.3.3. Par diffusion en milieu gélosé par gradient

25 mL de gélose MH (Mueller-Hinton Agar, Sigma) préalablement coulée sur une boîte de Pétri ronde (\varnothing 90 mm) ont été ensemencés par inondation comme décrit en 5.2.2.1 à l'aide d'une suspension de chaque souche diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau stérile, soit un volume final de 5 mL. Une bandelette en plastique ou en papier rigide (E-test, Biomérieux), imprégnée d'un gradient exponentiel d'un antibiotique donné sur l'une de ses faces et graduée sur l'autre face avec une échelle de concentration (**Fig.68A**), est déposée à la surface de la gélose préalablement séchée pendant 10 min à l'étuve (**Fig.68B**). Les boîtes sont incubées pendant 18-24 h à 37 °C avant analyse. La CMI correspond à la valeur comprise à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette (**Fig.68C**).

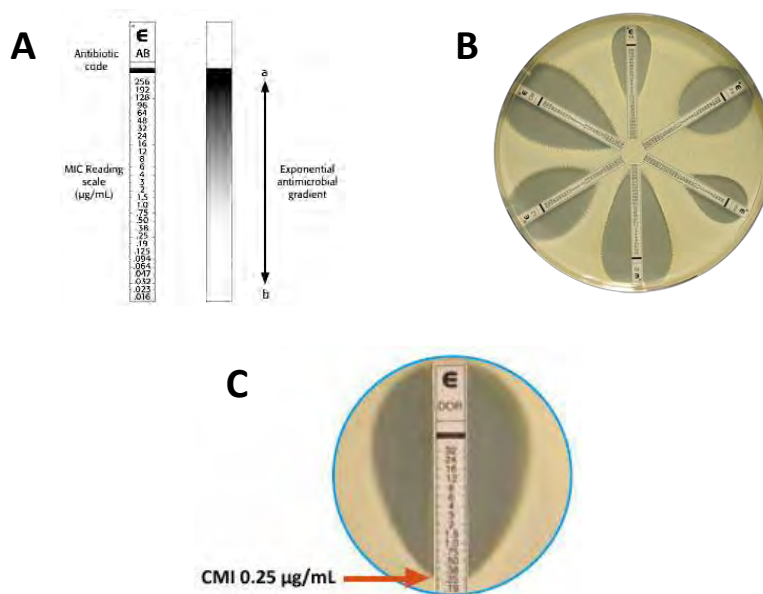


Figure 68 : AntibioGrammes par diffusion en gradient de concentration. **a)** Bandelette imprégnée d'un gradient exponentiel d'antibiotique sur l'une des faces et portant une échelle de concentration graduée sur l'autre face. **b)** Répartition des bandelettes sur la gélose préalablement ensemencée. **c)** Lecture de la valeur de la CMI.

5.2.4. Localisation cellulaire des mutants d'OprM chez *P. aeruginosa*

5.2.4.1. Sur cellules entières

Les cultures sont réalisées comme décrit en 5.2.1 pour chaque souche, y compris les cultures témoins (PAO1wt, PAO1 $\Delta oprM$ et PAO1 $\Delta oprM$ transformée avec le vecteur sans insert). Au bout d'une heure de culture ($DO_{600nm} \approx 0,12$ soit 0,5 McFarland correspondant à $\approx 10^8$ UFC/mL), chaque culture, à l'exception des cultures correspondant aux souches PAO1wt et PAO1 $\Delta oprM$, est additionnée de gentamicine ajoutée à une concentration finale de 15 $\mu\text{g/mL}$. Les cultures sont à nouveau incubées sous agitation (200 rpm) à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600nm} = 1$. Des cultures ont été réalisées en parallèle dans les mêmes conditions mais sans antibiotique afin de déterminer le taux d'expression des protéines en absence d'antibiotique. 500 μL de chaque culture sont prélevés et centrifugés à 11 000 g pendant une minute. Chaque culot est repris dans 50 μL d'eau et 50 μL de bleu de charge (4x). Tous les échantillons sont analysés sur gel SDS-PAGE 10 % (w/v) suivi d'une détection des protéines par western blot à l'aide d'un anticorps anti-His-HRP (Sigma) dirigé contre l'étiquette poly-histidine insérée au niveau de l'extrémité C-terminale.

5.2.4.2. Sur membranes isolées

200 mL de culture sontensemencés pour chaque souche, à partir d'une préculture réalisée comme décrit précédemment (§5.2.1). Les cultures et les cultures témoins sont réalisées comme décrit en 5.2.3.1. Une fois la $DO_{600nm} = 1$ atteinte, les cultures sont centrifugées pendant 30 min à 6 000 g à 18 °C. Les culots peuvent être conservés à -80 °C pour une utilisation ultérieure après congélation dans l'azote liquide. Les culots sont repris dans 20 mL de Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM et lysés à haute pression à l'aide d'un broyeur cellulaire (Cell-Disruptor, Constant LTD), à 4 °C après deux passages à 2,4 kbar. Le lysat est centrifugé à 6 000 g pendant 30 min à 4 °C et le surnageant est ultracentrifugé à 145 000 g pendant 1 h à 4 °C afin de récupérer la fraction correspondant aux membranes totales. L'opération est renouvelée après resuspension des culots dans 500 μL de Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM

afin de laver les membranes, et les culots sont repris dans 100 μL du même tampon. Un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma) est réalisé afin de déterminer la quantité de protéines dans les membranes et les échantillons sont solubilisés à une concentration protéique finale de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en présence de N-Lauryl Sarcosine (Sigma) à une concentration finale de 2 % (v/v) pendant 20 min à température ambiante. Les produits de solubilisation sont ultracentrifugés à 145 000 g pendant 45 min à 4 °C afin d'obtenir un culot correspondant à la fraction des membranes externes. Les surnageants, correspondant aux protéines de membrane interne solubilisées sont conservés pour servir de contrôle et les culots sont repris dans une solution de Tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM dont le volume est déterminé de façon à obtenir une concentration protéique finale de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. L'ensemble des échantillons est analysé sur gel SDS-PAGE 10 % (w/v) suivi d'une détection des protéines par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-His-HRP (Sigma) dirigé contre l'étiquette poly-histidine.

6. Etude des interactions OMF-MFP par BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis)

6.1. Le BN-PAGE (Blue Native Gel Electrophoresis) : principe et contexte

Il s'agit d'une technique de séparation des protéines en conditions natives initialement décrite par Schägger et *al.* (Schägger & Von, 1991), qui repose sur deux principes :

- ✚ l'analyse de complexes natifs à l'aide d'un gel en gradient continu d'acrylamide
- ✚ l'addition de bleu de Coomassie G250 qui confère aux protéines une densité de charge négative uniforme sans les dénaturer. Dans le cas de protéines membranaires, le bleu remplace le détergent utilisé au cours de la solubilisation. Les protéines se comportent donc comme des protéines solubles et migrent vers l'anode sous forme native et uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Le BN-PAGE permet de séparer des complexes dont la taille varie entre 10 kDa et 1 MDa. L'utilisation de protéines de référence de poids moléculaire connu comme marqueurs permet d'estimer les poids moléculaires des protéines et de déterminer l'état d'oligomérisation des complexes. Dans le cadre de l'étude de l'assemblage des pompes à efflux, le choix des protéines de calibration est effectué sur la base des courbes de calibration décrites par Schägger et *al.* (Schägger, Cramer, & von Jagow, 1994) et par Ferrandez, Monlezun et *al.* (Ferrandez et al., 2012). Nous avons notamment utilisé l'Apoferitine (443 kDa, 886 kDa et 1329 kDa correspondant respectivement aux formes monomérique, dimérique et trimérique) et l'Albumine (66 kDa, 132 kDa et 198 kDa correspondant respectivement aux formes monomérique, dimérique et trimérique) issues d'un kit de calibration de gel filtration (Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29 000-700 000 Da, Sigma).

Le protocole a été optimisé et réalisé comme décrit par Ferrandez, Monlezun et *al.* (Ferrandez et al., 2012). Afin de minimiser les risques d'agrégation non spécifique, un détergent non ionique est ajouté dans le gel. Le DDM est préférentiellement utilisé à la place du β OG car, dans les conditions de migration, les protéines agrègent fortement en sa

présence et ne rentrent pas dans le gel, probablement à cause d'un mauvais échange du β OG par le bleu de Coomassie. Toutes les protéines doivent donc être purifiées dans du DDM.

6.2. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés comme décrit précédemment (Ferrandez et al., 2012). 100 pmoles de protéines, préalablement purifiées comme décrit précédemment (§2.2.1, 2.2.2, 2.2.3) sont incubées seules ou en complexes dans 30 μ L du tampon Imidazole 7,5 mM pH 7,5, Glycérol 10 % (v/v), DDM 0,02 % (v/v) à température ambiante pendant 45 min. Les complexes sont réalisés à différents ratios. Les solutions sont ensuite incubées pendant 15 min à température ambiante avec du bleu de Coomassie G250 à une concentration finale de 0,02 % (v/v) avant d'être déposées sur gel. 10 μ g de protéines de calibration sont également déposées sur gel (Apoferitine et Albumine).

6.3. Préparation du gel gradient et migration

Des gels de polyacrylamide d'1 mm d'épaisseur sont réalisés à l'aide d'une pompe péristaltique comme décrit par Ferrandez, Monlezun et al. (Ferrandez et al., 2012). Le gel de séparation est réalisé avec un gradient de concentration continu de 4 % à 16 %. Le gradient est réalisé de façon décroissante du bas vers le haut du gel et le gel de concentration est ajouté de façon identique à un gel SDS-PAGE classique, après polymérisation du gel de séparation. De l'acide 6-aminohexanoïque (0,25 M) et du DDM (0,02%) sont ajoutés au gel.

Des tampons différents pour l'anode et la cathode sont utilisés pour la migration. Le tampon d'anode est constitué d'imidazole 25 mM, pH 7,5. La migration est réalisée à un voltage constant de 100 V à 4 °C avec un premier tampon de cathode constitué de 50 mM Tricine, Imidazole 7,5 mM, pH 7,5, bleu de Coomassie G250 0,02 % (w/v). Une fois que le front de migration a atteint le 1/3 du gel, le tampon de cathode est remplacé par un second

tampon identique au premier mais 10 fois moins concentré en bleu de Coomassie (0,002 % (w/v)) afin de réduire le bruit de fond du bleu sur le gel. Les gels sont colorés après migration dans du bleu de Coomassie G250 dilué dans une solution d'acide acétique 10 % (v/v) afin d'augmenter le signal des bandes peu intenses. Afin de déterminer la composition des complexes, les bandes correspondantes sont découpées et analysées sur gel SDS-PAGE.

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

1. La pompe MexEF-OprN et la résistance aux fluoroquinolones : Caractérisation structurale et fonctionnelle du canal OprN

Parmi les 12 pompes d'efflux de la famille RND dénombrées chez *P. aeruginosa*, les pompes MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ et MexJK-OprM ont été décrites comme étant principalement impliquées dans la résistance aux antibiotiques, du fait de leur surexpression chez des mutants cliniques résistants. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la pompe MexEF-OprN, surexprimée chez des isolats cliniques résistants au chloramphénicol et aux fluoroquinolones, notamment à la ciprofloxacine (mutants *nfxc*) (Köhler & al, 1997 ; Llanes & al, 2011). Cette pompe présente donc un intérêt particulier, étant décrite comme impliquée dans l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones, classe d'antibiotiques la plus utilisée avec les β -lactamines.

De plus, la surexpression de la pompe implique un influx constant de protons pour alimenter la force protomotrice, provoquant une acidification du cytoplasme. Chez des mutants surexprimant la pompe MexEF-OprN, il a été mis en évidence une augmentation de la consommation en oxygène, empêchant l'accumulation de protons intracellulaires, permettant donc de réduire l'acidification du cytoplasme (Olivares & al, 2014). Le développement d'inhibiteurs de la pompe, outre le blocage de l'efflux des antibiotiques dont elle est spécifique, pourrait donc permettre de limiter cette compensation métabolique et de réduire la persistance du phénomène de résistance. Mais avant de pouvoir développer des inhibiteurs spécifiques, une meilleure connaissance des composants de la pompe et une meilleure compréhension du mécanisme d'assemblage sont nécessaires.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation structurale de la protéine de la membrane externe, OprN. Une seule structure cristallographique de protéine OMF avait été résolue à ce jour chez *P. aeruginosa*, celle du canal OprM (Akama & al, 2004 ; Phan & al, 2010 ; Monlezun & al, 2015). Bien que d'autres structures d'OMFs appartenant à d'autres bactéries aient dorénavant et déjà été résolues (voir **Chapitre I**, § 4.1.2), il nous semblait important de visualiser les variations existant entre les différentes OMFs de *Pseudomonas aeruginosa*, afin de comprendre leur spécificité d'assemblage. Nous présentons dans ce chapitre la production et la structure cristallographique du canal OprN.

1.1. Production et cristallisation du canal OprN

1.1.1. Expression et purification

Le canal OprN est surexprimé de façon recombinante chez *E. coli*. La protéine mature entière, fusionnée à une étiquette poly-histidine (6-His) ajoutée au niveau de l'extrémité C-terminale, est produite à partir de la souche C43 Δ *acrB* (**Tableau II.3**), qui nous a été fournie par le Pr. K. Pos (université de Francfort, Allemagne). La souche C43 permet de limiter les problèmes de cytotoxicité liés à la surexpression des protéines membranaires. La délétion du transporteur RND natif d'*E. coli* permet de s'affranchir d'une contamination éventuelle par la protéine AcrB, cette dernière possédant une étiquette histidine naturelle, qui entraîne une contamination des purifications par affinité sur colonnes de nickel. L'expression est induite à 18°C sur la nuit afin d'améliorer le rendement de production.

La protéine est extraite des membranes externes d'*E. coli*, en présence de dodécyl- β -maltoside (DDM) (voir § III.2.2.1). Elle est ensuite purifiée jusqu'à homogénéité grâce à deux étapes de chromatographie (affinité et exclusion stérique) qui permettent notamment de procéder à l'échange de détergent. Le DDM, utilisé pour la solubilisation, est remplacé par du β -octyl-D-glucopyranoside (β OG), la protéine ne cristallisant pas en DDM, à l'instar de son analogue OprM. La purification s'effectue en absence de glycérol car la protéine a tendance à agréger en sa présence, contrairement à OprM. La protéine est éluée après chromatographie d'exclusion stérique sous la forme d'un pic majoritaire (non présenté) correspondant à l'homotrimère d'OprN. Les échantillons analysés sur gel SDS sont traités de façon à conserver le trimère (non chauffés) (**Fig. 69**, puits 2 et 3) ou à le dissocier (chauffés à 95°C pendant 5 min) (**Fig. 69**, puits 4 et 5). Une faible proportion de la forme trimérique est préservée et reste stable malgré la présence de SDS dans le tampon de dépôt.

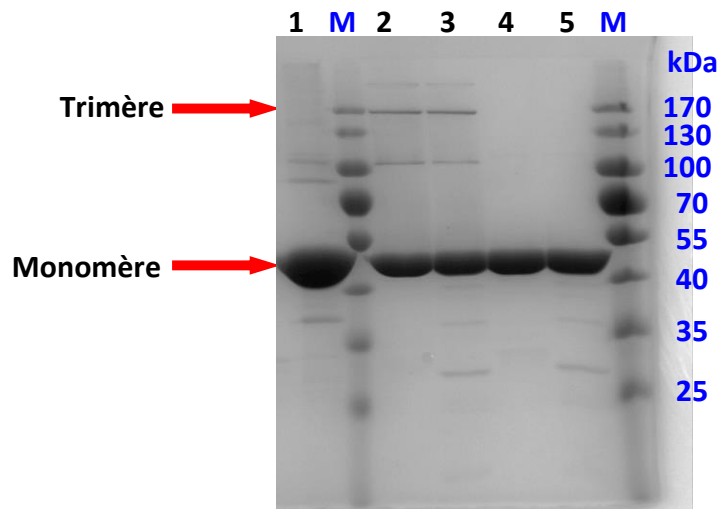


Figure 69 : Analyse des fractions d'OprN éluées après chromatographie d'exclusion stérique. Les fractions ont préalablement été chauffées afin de dissocier les monomères (puits 4 et 5) ou non chauffées afin de préserver le trimère (puits 2 et 3). Une moitié de l'échantillon a subi une étape de protéolyse ménagée à la trypsine avant l'étape de chromatographie d'exclusion stérique (puits 3 et 5), le reste n'étant pas protéolysé (puits 2 et 4). La protéine OprM (sous forme monomérique), sert de contrôle de poids moléculaire (puits 1).

Tout comme pour son homologue OprM (code PDB 4Y1K) (Monlezun & al, 2015), chaque monomère d'OprN est acylé (palmitoylé) au niveau de sa cystéine N-terminale. Chaque monomère correspond à une masse moléculaire moyenne d'environ 48 kDa (hors palmitate et étiquette poly-histidine), calculée à partir du programme Protparam (Gasteiger & al, 2005). Une étape de protéolyse ménagée à la trypsine a été réalisée sur une moitié de l'échantillon protéique destiné à la cristallisation avant la purification par chromatographie d'exclusion stérique (**Fig. 69**, puits 3 et 5). Les fractions éluées sont ensuite concentrées respectivement à 12 mg/mL pour la forme protéolysée et à 10 mg/mL pour la forme non protéolysée, soit un rendement final de 1mg/litre de culture.

1.1.2. Cristallisation

Différentes concentrations de protéines (4-12 mg/mL) ont été utilisées au cours des différents essais de cristallisation. Certains échantillons ont été préalablement traités par protéolyse ménagée à la trypsine afin d'améliorer le pouvoir de diffraction des cristaux et les essais de cristallisation ont été réalisés à partir des deux formes (protéolysée et non protéolysée). Plusieurs pistes de cristallisation sont obtenues pour les deux formes au bout d'une semaine à 18°C à partir de trois kits commerciaux [*MemGold*TM (MD1-39), *MemGold2*TM (MD1-63) et *MemStart*TM/*MemSys*TM HT-96 (MD1-21 et MD1-25)]. Quatre conditions (résumées par le **Tableau 12**) ont été optimisées manuellement, uniquement pour la forme protéolysée et trois de ces conditions ont permis d'obtenir des cristaux (**1-3**), la quatrième condition (**4**) ayant conduit la formation de précipités.

Plusieurs conditions de cristallisation, optimisées manuellement à partir de la condition 3 du **Tableau 12**, en utilisant la forme protéolysée d'OprN concentrée à 12 mg/mL, ont permis d'obtenir des cristaux en forme d'aiguille (**Fig. 70**). 25 % de glycérol (v/v)] ont été ajoutés aux cristaux comme cryoprotectant au moment de la congélation. Ces cristaux ont permis de collecter plusieurs jeux de données complets dont un à une résolution relativement haute pour une protéine membranaire (2,3 Å) à partir d'une condition contenant 100 mM d'Acétate de Sodium, pH 5.4, 1.1 M de Formate de Potassium, 8.8 % PEG 4000 (w/v) et 0.9 % β OG (w/v).

Conditions	Solution de cristallisation
1 (<i>Memstart-23</i>)	100 – 400 mM Sulfate de Lithium, 100 mM ADA, pH 6.5, 20 – 35 % PEG 400 (v/v), 0,9 % βOG (w/v)
2 (<i>MemGold2 – 2 -20</i>)	200 – 500 mM Sulfate d’ammonium, 100 mM MES, pH 6.5, 5 – 20 % PEG 3350 (w/v), 0,9 % βOG (w/v)
3 (<i>MemGold2 – 2 -27</i>)	0,4 – 1 M Formate de Potassium, 100 mM Acétate de Sodium, pH 5.4, 9 – 17 % PEG 4000 (w/v), 0,9 % βOG (w/v)
4 (<i>MemGold – 1 -41</i>)	50 mM Acétate de Magnésium, 50 mM Acétate de sodium pH 5.4, 24 % PEG 400 (v/v), 0,9 % βOG (w/v)

Tableau 12 : Récapitulatif des conditions de cristallisation d’OprN optimisées manuellement. Les kits utilisés et les positions correspondant aux différentes conditions sont indiqués entre parenthèses. Le β OG provient du tampon de purification qui contient également du Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM.

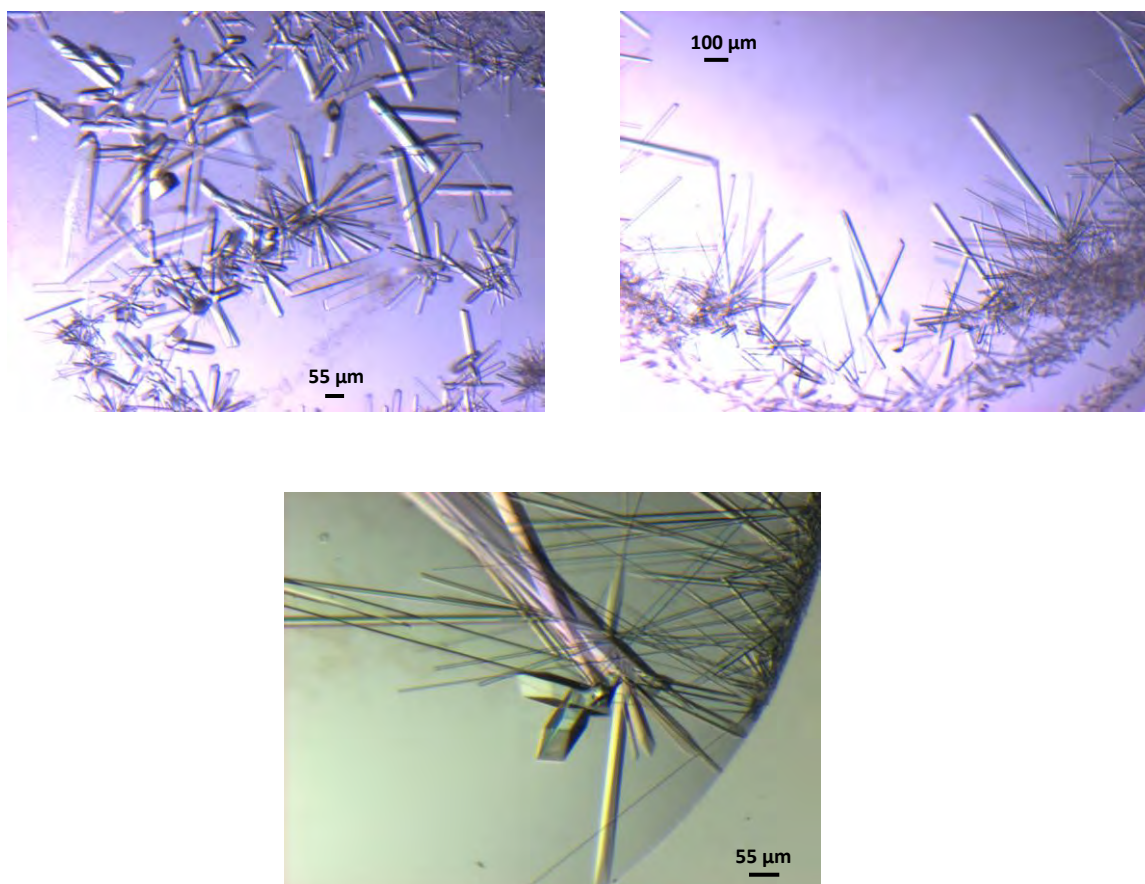


Figure 70 : Cristaux d’OprN obtenus au bout d’une semaine à 18°C (à 12 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après optimisation manuelle à partir de la condition 3.

1.2. Résolution de la structure cristallographique du canal OprN

Le jeu de données complet obtenu à la plus haute résolution (2,3 Å) a été enregistré à partir de 2560 images collectées à une longueur d'onde de 0,873 Å. La **Figure 71** présente un exemple de cliché de diffraction enregistré pour ce jeu de données. Les données ont été enregistrées avec un pas d'oscillation de 0,05° sur la ligne microfocuse ID-23-2 de l'ESRF (Grenoble) dédiée aux microcristaux, permettant une meilleure séparation des tâches de diffraction, et un meilleur signal sur bruit.

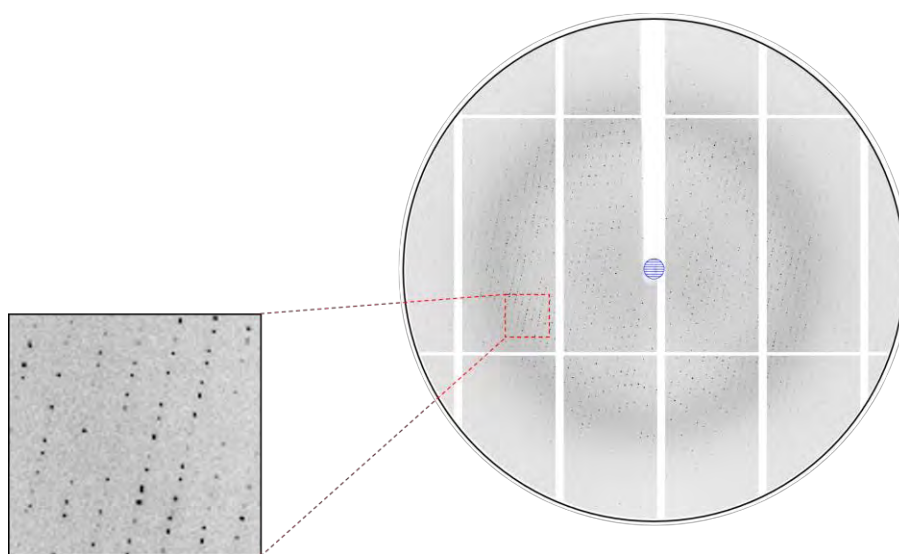


Figure 71 : Cliché de diffraction d'un cristal d'OprN diffractant à 2.3 Å de résolution. La limite de diffraction est homogène sur l'image, indiquant un cristal isomorphe. L'extrait zoomé permet de voir que les tâches sont bien séparées.

L'indexation et l'intégration de ce jeu de données ont été réalisées à l'aide du programme *iMOSFLM* dans le groupe d'espace tétragonal I4, conduisant à un jeu complet (99,4%) avec un facteur d'accord de 15% à 2,3Å. La structure cristallographique d'OprN a été publiée par un autre groupe à la fin de notre étude, dans le même groupe d'espace à 1,69 Å de résolution (code PDB 5AZP) avec des paramètres de maille similaires aux nôtres (Yonehara & al, 2016). Ils ont également résolu cette même structure à 2,7 Å de résolution

dans le groupe d'espace trigonal P321, présentant donc une seule molécule par unité asymétrique, le trimère étant reconstitué par la symétrie du cristal (code PDB 5AZO). Les statistiques d'intégration et d'affinement des trois structures sont résumées dans le **Tableau 13**.

		Cette étude	Yonehara & al, 2016	Yonehara & al, 2016
Statistiques d'intégration				
Longueur d'onde (Å)		0.873	0.900	0.900
Distance cristal – détecteur (nm)		213.32	-	-
Groupe d'espace		I4	I4	P321
Paramètres de maille	a, b, c (Å)	257.65 ; 257.65 ; 81.511	257.5 ; 257.5 ; 81.8	76.5 ; 76.5 ; 191.8
	α , β , γ (°)	90 ; 90 ; 90	90 ; 90 ; 90	90 ; 90 ; 120
Coefficient de Matthews (Å ³ /Da)		4.51	4.55	3.26
Pourcentage de solvant (%)		72.7	72.97	62.29
Résolution (Å)		182.185 – 2.29 (2.34 – 2.29)	50.00 – 1.69 (1.72 – 1.69)	50.00 – 2.70 (2.75 – 2.70)
Nombre de réflexions observées		120 493	297 648	18 601
Nombre de réflexions uniques		113 747	282 614	17 736
R _{merge} (%)		14.9 (75.5)	6.8 (8.59)	16.4 (>100)
Complétude (%)		99.4 (99.5)	99.5 (99.4)	100 (100)
Redondance		4.88 (4.49)	3.6 (3.4)	10.9 (11.1)
I / σ (I)		8.04 (1.76)	22.9 (1.6)	17.1 (2.5)
Statistiques d'affinement				
Contenu de l'unité asymétrique (kDa)		144	144	48
R _{work} / R _{free}		18.80 / 22.53	16.01 / 17.97	23.15 / 27.19
Nombre d'atomes (protéine)		10 433	10 846	3 413
Nombre de molécules d'eau		694	1885	-
Nombre d'ions		2	12	-
Nombre de positions alternées		11	94	-
Nombre de ligands	Détergent	3	8	-
	Formate	1	18	-
	Autres	-	12	-
Déviation r.m.s	Pour les liaisons (Å)	0.020	0.019	0.010
	Pour les angles (°)	2.074	1.973	1.336
Facteur de température (B) moyen (Å ²)		35.643	26.5	49.4
Diagramme de Ramachandran	Zones favorables (%)	98.07	99.0	98.2
	Zones permises (%)	1.78	0.8	1.6
	Zones défavorables (%)	0.15	0.2	0.2

Tableau 13 : Statistiques d'intégration et d'affinement des trois structures d'OprN. Les données indiquées entre parenthèses correspondent à la couche de plus haute résolution. Les deux dernières structures ont été résolues par un autre groupe (Yonehara & al).

Notre structure cristallographique d'OprN a été résolue par remplacement moléculaire à l'aide du programme *PHASER*, à partir d'un modèle construit sur la base de la structure du trimère de son analogue OprM (code PDB 3D5K) (Phan & al, 2010) et de la séquence protéique d'OprN. La carte de densité électronique correspondant à la région équatoriale était très bruitée, de par la mauvaise position de la chaîne polypeptidique dans cette zone. OprN et OprM présentent 31,4% d'identité de séquence, mais moins de 23% dans cette région. Un modèle a donc été construit dans lequel tous les fragments peptidiques du domaine équatorial situés en dehors de la carte de densité électronique ont été substitués par une séquence poly-Alanine.

La carte de densité électronique résultante, obtenue après affinement par le programme *REFMAC* a permis de reconstruire manuellement le reste du domaine équatorial selon la séquence protéique d'OprN, à l'aide du programme *COOT*. Elle a également permis de reconstruire 4 résidus de l'étiquette poly-histidine (6 His) de l'un des monomères (chaîne C) sur les 6 qui la constituent, ainsi qu'une molécule de détergent (β OG) voisine. La carte de différence $F_o - F_c$ montre cependant la présence de densité électronique résiduelle dans cette région, dont une partie ressemble fortement à la tête polaire d'une molécule de β OG. Nous n'avons pas pu remplir cette densité électronique, car cela entraînait des problèmes d'encombrements stériques, notamment au niveau du résidu Glu139. Nous pensons donc qu'il s'agit d'une conformation alternative de toute cette région C-terminale, que nous n'avons malheureusement pas pu reconstruire.

Les molécules d'eau ont été placées au cours de la reconstruction automatique par le programme *ARP/wARP*. Néanmoins, malgré l'application de critères de sélection de distance aux atomes environnants, certaines d'entre elles avaient été placées dans des régions inadéquates, telles que la surface hydrophobe du domaine transmembranaire, et ont donc été supprimées manuellement. Celles qui présentaient des facteurs de température inférieurs à celui de l'atome auquel elles étaient liées ont été remplacées par des ions, de coordination hexa- ou divalente (Na^+ , Cl^-), présents dans le tampon de purification. Des amas de densité électronique résiduels ont quant à eux permis de reconstruire deux molécules de détergents (β OG) au niveau du domaine transmembranaire et une juste au-dessus du domaine équatorial (décrite précédemment).

La présence de densité électronique au niveau de l'extrémité N-terminale de chacun des monomères a permis de reconstruire le groupement acyl (palmitate) au niveau de la cystéine N-terminale libre. Il n'a cependant pas pu être reconstruit dans son intégralité, et est limité à 7 à 10 atomes de carbone au lieu des 16 attendus selon la chaîne considérée, du fait de la grande flexibilité de cette extrémité. En plus du palmitate lié au groupement thiol de la cystéine, deux chaînes acyl de 5 carbones ont été ajoutées au niveau de l'amine N-terminale libre des chaînes A et C.

Sur les 1359 résidus du trimère, comprenant les trois étiquettes de six histidines, 1341 ont été construits, représentant 98,7 % de la structure. Seuls les deux derniers résidus ainsi que la queue histidine sont manquants sur les chaînes A et B. A l'inverse, la chaîne C est complète, à l'exception des deux dernières histidines de l'étiquette C-terminale, du fait de sa stabilisation par la molécule de β OG. Cette particularité de la chaîne C n'est pas entièrement due à une différence d'environnement des trois molécules liée à l'empilement cristallin, vu que l'une des structures résolues par Yonehara & al appartient au même groupe d'espace mais ne présente pas cette singularité.

Aucun autre fragment peptidique ne manque dans la structure. La protéolyse a donc probablement contribué à favoriser la nucléation en clivant des contaminants.

La géométrie de la structure finale a été vérifiée et validée à l'aide des modules de validation du programme *COOT* et du programme de validation de structure en ligne *MolProbity*. Le diagramme de Ramachandran représenté par la **Figure 72** indique que 98,07% des résidus se trouvent dans les régions favorables.

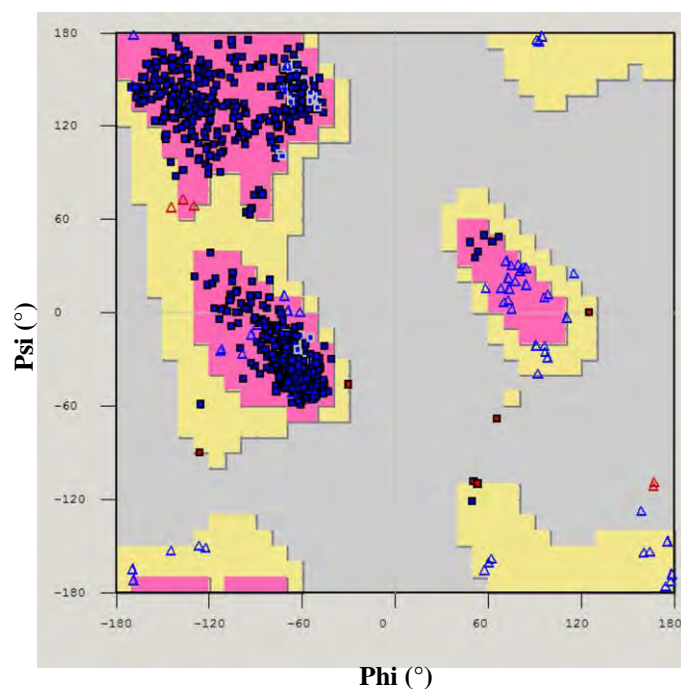


Figure 72 : Diagramme de Ramachandran de la structure cristallographique d'OprN, résolue dans le groupe d'espace I4, obtenu à l'aide du module de validation du programme COOT.

1.3. Analyse structurale

1.3.1. Vue d'ensemble

La structure cristallographique d'OprN résolue à 2,3 Å de résolution montre que la protéine forme un canal long de 130 Å dont l'architecture est similaire à celle des autres OMF dont la structure a été résolue (**Fig. 73A**). Chaque monomère est constitué de deux principaux domaines, le domaine β et le domaine α . Il est à noter que l'on retrouve un motif structural répété au sein de chaque monomère (**Fig. 73C**), motif qui est conservé chez les bactéries Gram négatif.

1.3.1.1. Le domaine β

Le domaine β , long de 30 Å correspond au domaine transmembranaire du canal. Ce domaine est constitué de quatre brins β qui forment un feuillet incurvé. Cette inclinaison permet un emboîtement avec le feuillet β du monomère voisin pour former un tonneau caractéristique de la famille des OMFs. Les brins S1 et S2 ainsi que les brins S3 et S4 sont reliés par des boucles extracellulaires. La longueur de ces boucles ainsi que la présence ou non de pseudo-hélices varient suivant les OMFs. Pour OprN, elles sont de 13 et 9 résidus respectivement, et la boucle S3-S4 présente une petite pseudo-hélice qui inclut les résidus Gly306 à Gln308.

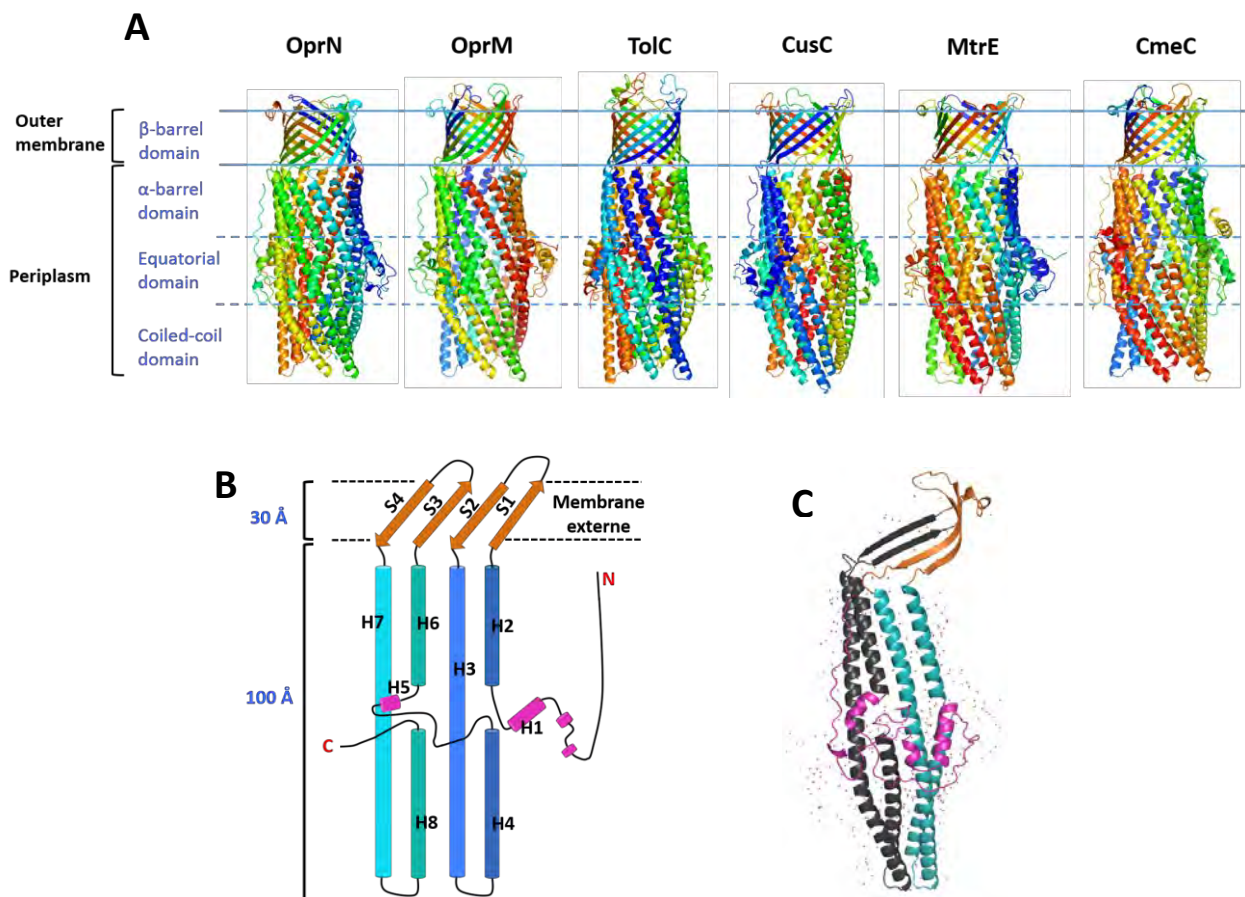


Figure 73 : Structures et architecture générale des OMF (A). OprN et OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (code PDB : 5IUJ et 3D5K), TolC et CusC d'*E. coli* (code PDB : 1EK9 et 3PIK), VceC de *Vibrio cholerae* (code PDB : 1YC9), CmeC de *Campylobacter jejuni* (code PDB : 4MT4), MtrE de *Neisseria gonorrhoeae* (code PDB : 4MT0). La topologie et la structure du monomère d'OprN sont représentées respectivement par les figures B et C. Le motif structural répété conservé chez les bactéries Gram négatif est représenté en noir au sein du monomère (C).

Deux molécules de β OG sont retrouvées dans la structure au niveau de ce domaine β (**Fig. 74**). L'une d'entre elles adopte une position identique à celle des phospholipides dont la tête polaire est orientée vers le milieu intra- ou extracellulaire et la chaîne latérale hydrophobe enfouie à l'intérieur de la bicouche lipidique. Cette molécule de β OG interagit, via sa chaîne latérale hydrophobe avec la surface hydrophobe du domaine β et avec le palmitate de l'extrémité N-terminale voisine, grâce à des interactions hydrophobes. Ces contacts miment probablement l'interaction de ce domaine avec les lipides membranaires chez la bactérie. La seconde molécule de β OG interagit plutôt avec les boucles extracellulaires par l'intermédiaire de sa tête polaire, grâce à des liaisons hydrogène.

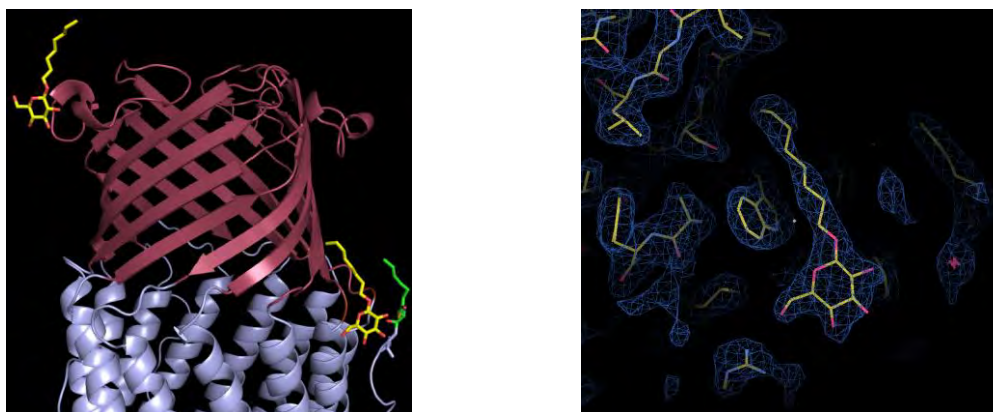


Figure 74 : Les molécules de détergent présentes au niveau du domaine β transmembranaire d'OprN. Le β OG localisé à proximité du palmitate (représenté en vert sur l'image de gauche) mime la bicouche lipidique. La carte de densité électronique (à 0.8σ de contour) (image de droite), montre cette molécule dans son environnement cristallin.

Au niveau du tonneau β , les trimères d'OprN s'assemblent au sein du cristal suivant un empilement de type I (**Fig. 75**), c'est à dire en position « tête-bêche » les uns par rapport aux autres. Ce type d'assemblage, favorisant l'empilement grâce aux contacts hydrophobes, est caractéristique des protéines membranaires, mimant ainsi une membrane plane.

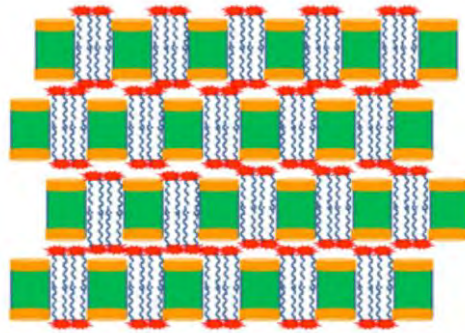


Figure 75 : Empilement de type I. les contacts cristallins se font par l'intermédiaire des surfaces hydrophobes positionnées dans le même plan. Les protéines sont représentées en vert-orange et les détergents en rouge-noir, avec la tête polaire en rouge et la chaîne latérale hydrophobe en noir (Adapté de Krauss & al, 2013, International Journal of Molecular Sciences).

Cet empilement cristallin est également observé chez OprM. Néanmoins pour OprM, les domaines β de trimères voisins sont exactement dans le même plan, alors que pour OprN, ils présentent un léger décalage, le rendant beaucoup moins compact (**Fig. 76**). Ceci peut expliquer pourquoi la queue lipidique en N-terminal est mieux définie pour OprM que pour OprN malgré une moins bonne résolution.

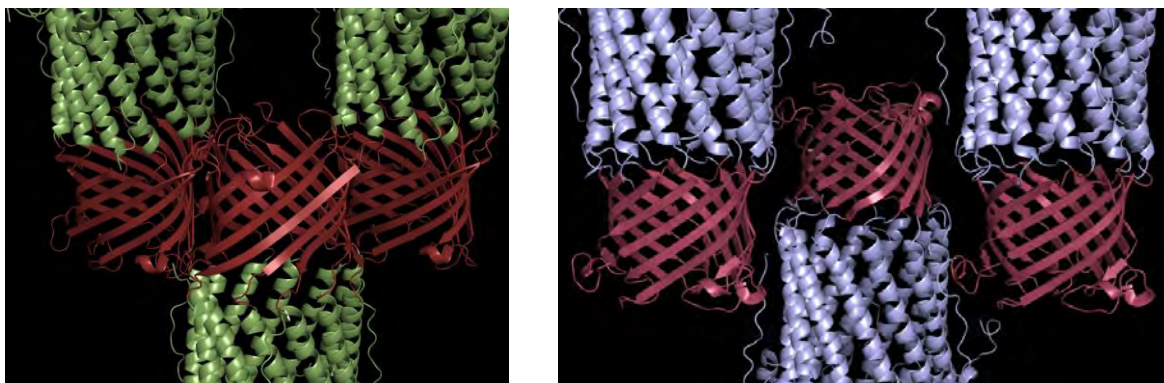


Figure 76 : Empilement cristallin de type I d'OprM (à gauche) et d'OprN (à droite).

1.3.1.2. Le domaine α

Le domaine α , correspondant au domaine périplasmique, est long de 100 Å. Il est constitué de 6 hélices α . Deux d'entre elles, les hélices H3 et H7 traversent entièrement le domaine périplasmique, tandis que les quatre autres sont reliées par paire (H6 – H8 et H2 – H4) pour former deux pseudo-hélices de même longueur que H3 et H7. Les segments de liaison sont peu structurés, formant le domaine équatorial encore appelé bouée, qui ceinture le domaine périplasmique.

Ce domaine équatorial est majoritairement constitué de boucles, et inclut l'extrémité C-terminale et une partie de l'extrémité N-terminale. Il comporte également deux petites hélices, H1 et H5 et deux petites pseudo-hélices. Les quelques résidus de l'extrémité C-terminale ainsi que l'étiquette poly-histidine qui ne sont pas présents dans la structure font partie de ce domaine. C'est également dans cette zone que se trouve la molécule de β OG piégée par l'étiquette histidine dans le 3ème monomère.

La présence de détergents au niveau de ce domaine pourtant hydrophile est permise par l'empilement de type II observé pour la partie périplasmique, dans lequel les contacts polaires impliquent les têtes polaires des détergents (**Fig. 77**).

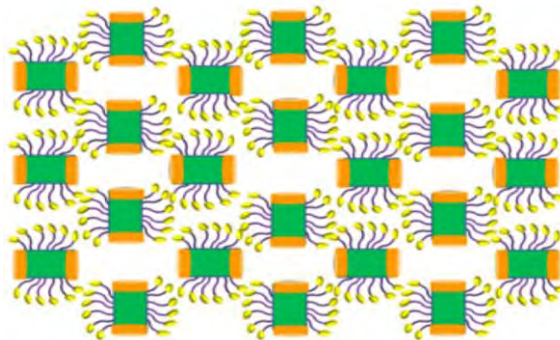


Figure 77 : Empilement de type II. Les contacts cristallins se font par l'intermédiaire des têtes polaires des détergents. Les protéines sont représentées en vert-orange et les détergents en jaune-violet, avec la tête polaire en jaune et la chaîne latérale hydrophobe en violet (Adapté de Krauss & al, 2013, International Journal of Molecular Sciences)

Dans le cas d'OprN, les contacts polaires ont lieu au sein du cristal entre l'extrémité périplasmique d'un trimère et le domaine équatorial du trimère voisin (**Fig. 78**).

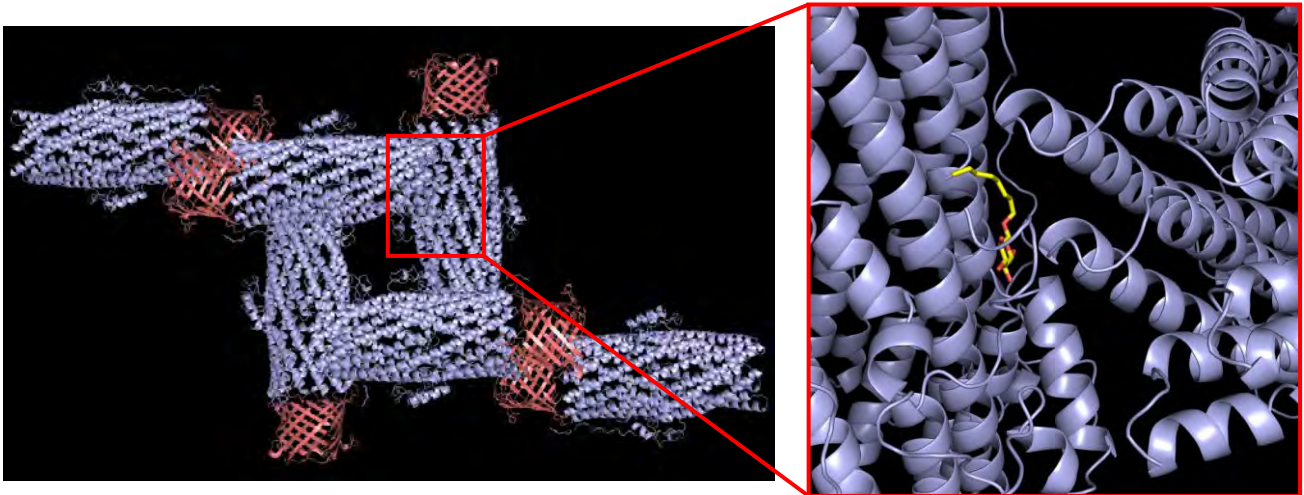


Figure 78 : Empilement cristallin de type II d'OprN. La vue agrandie montre une molécule de β OG (en jaune) piégée à l'interface entre le domaine équatorial et l'extrémité périplasmique de deux trimères.

Néanmoins, ces contacts polaires impliquent des résidus dont la nature varie au sein du packing, ce qui pourrait expliquer la présence d'une seule molécule de β OG, uniquement au niveau du monomère C.

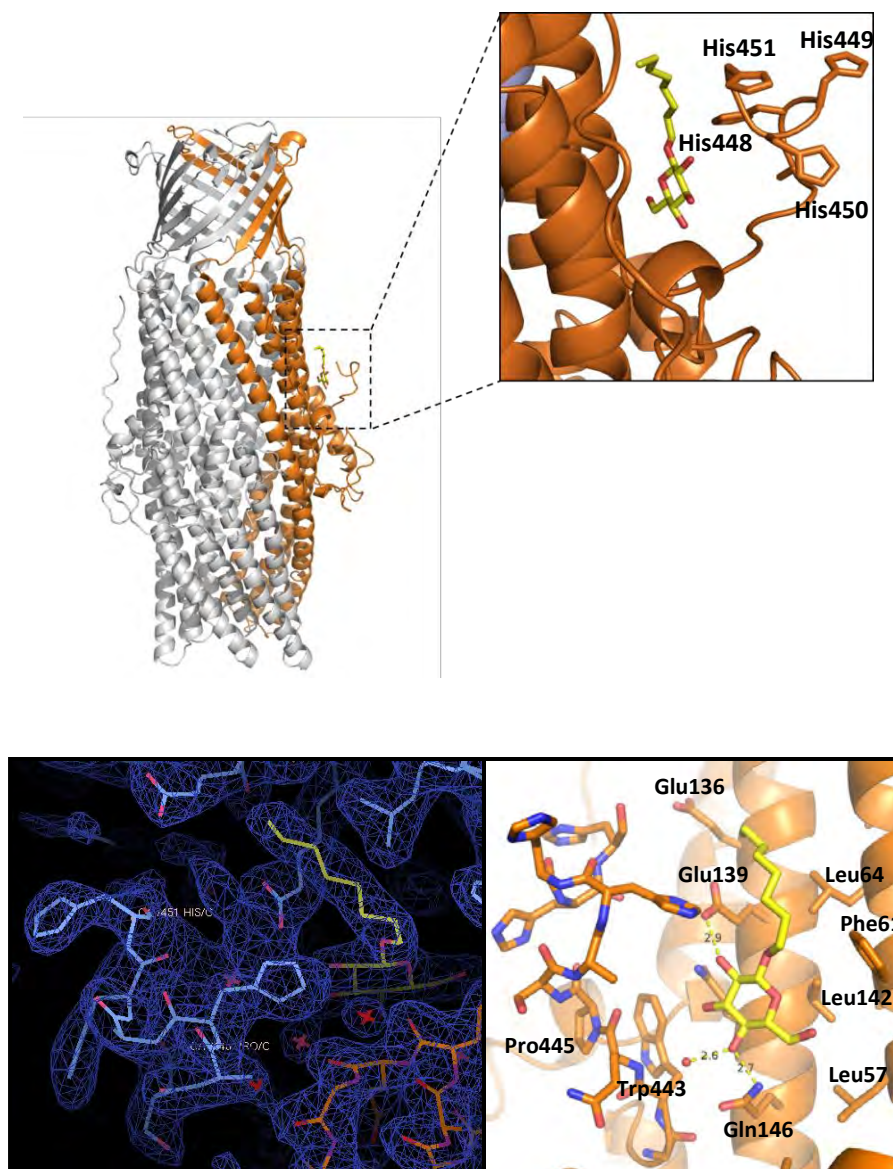


Figure 79 : La vue élargie de l'extrémité C-terminale d'un monomère montre la présence d'une molécule de détergent (en jaune) piégée par l'étiquette poly-histidine (panneau supérieur). La carte de densité électronique et la vue agrandie (panneau inférieur) montrent l'environnement cristallin partiel de la molécule de β OG.

1.3.2. Les extrémités extracellulaire et périplasmique du canal OprN

OprN, tout comme les autres OMFs, présente une extrémité extracellulaire qui ouvre le domaine β transmembranaire sur le milieu extracellulaire et une extrémité périplasmique

qui ouvre le domaine coiled-coil sur le périplasma. Contrairement à d'autres structures d'OMFs résolues en conformation ouverte (TolC, MtrE), la structure d'OprN a été résolue en conformation fermée (**Fig. 80**).

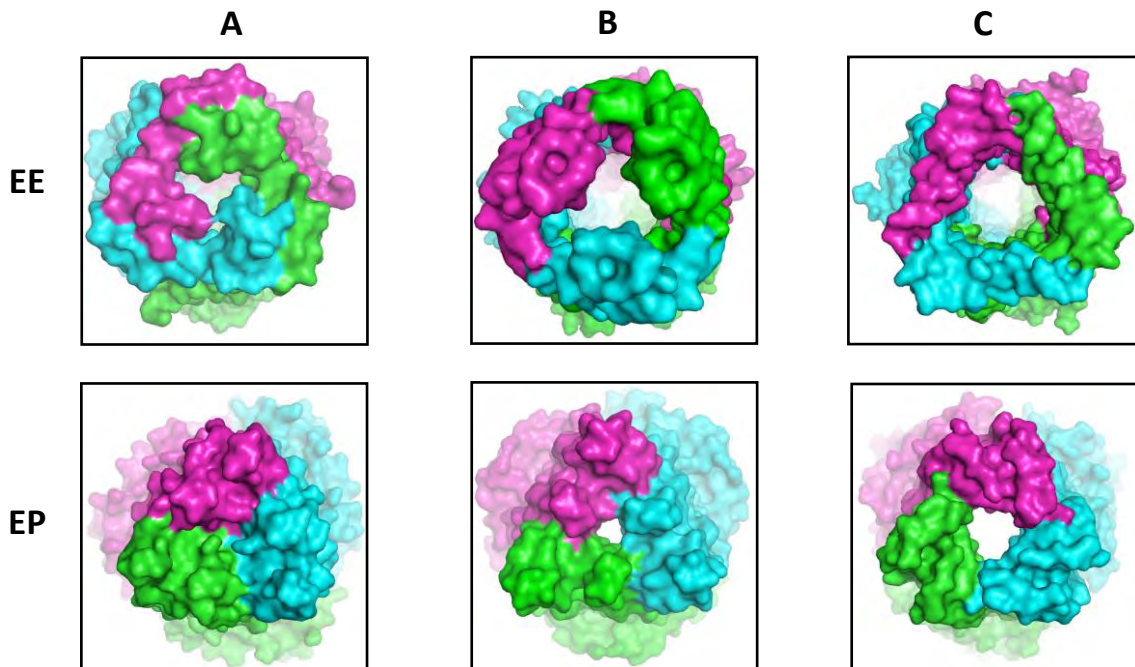


Figure 80 : Représentation des extrémités extracellulaire (EE) et périplasmique (EP) d'OprN (A), de TolC (B) et de MtrE (C). La comparaison des extrémités d'OprN avec celles de TolC ou de MtrE montre que le canal est en conformation fermée. Les trois monomères sont représentés en magenta, en cyan et en vert.

Du côté extracellulaire, les résidus 94-102 de chaque monomère forment une boucle flexible entre les brins β S3 et S4. Les boucles des trois monomères ferment l'extrémité du domaine β par une interaction de van der Waals au niveau des trois résidus Val98 (**Fig. 81**). Ce résidu n'est ni conservé au sein des OMFs de *P. aeruginosa*, ni conservé chez les bactéries Gram négatif. Il est remplacé par un résidu polaire chez OprM (Thr105) et un résidu aliphatique (Gly271) chez TolC (**Fig. 81**). Ce résidu réduit le diamètre de l'extrémité extracellulaire à un pore d'environ 3 Å, contrairement à la structure de TolC qui présente un canal plus ouvert de diamètre 6 Å. Les substrats de la pompe MexEF-OprN tels que la ciprofloxacine sont plus larges que ce pore. L'efflux des substrats implique donc une

ouverture de l'extrémité extracellulaire avec un mouvement des boucles vers l'extérieur. Elles semblent donc impliquées dans la sortie des substrats au cours de l'efflux, mais sont surtout supposées jouer le rôle de gardien de l'influx, les protéines OMFs n'étant pas supposées constituer une porte d'entrée vers l'intérieur de la cellule.

Le diamètre interne du canal est de 35 Å et ce diamètre est relativement constant du domaine β au domaine équatorial. L'ouverture du canal se réduit progressivement à partir du domaine équatorial pour s'obturer complètement au niveau de l'extrémité périplasmique à cause de la torsion des hélices internes (H4 et H8) et des hélices externes (H3 et H7).

L'ouverture et la fermeture du canal au niveau de cette extrémité sont régulées par un réseau de liaisons hydrogène et de ponts salins inter- et intramonomériques formés par des résidus présents à l'extrémité des quatre hélices du domaine coiled-coil de chaque monomère. Ce réseau est constitué de résidus polaires et chargés (Asp197, Arg396, Tyr397, Thr402, Asp409, Arg412). Ces résidus sont conservés au sein des OMFs chez *P. aeruginosa* mais également chez *E. coli*, à l'exception de la thréonine Thr402 d'OprN qui est remplacée par un aspartate, Asp409 chez OprM et par une glycine, Gly365 chez TolC (**Fig. 81**).

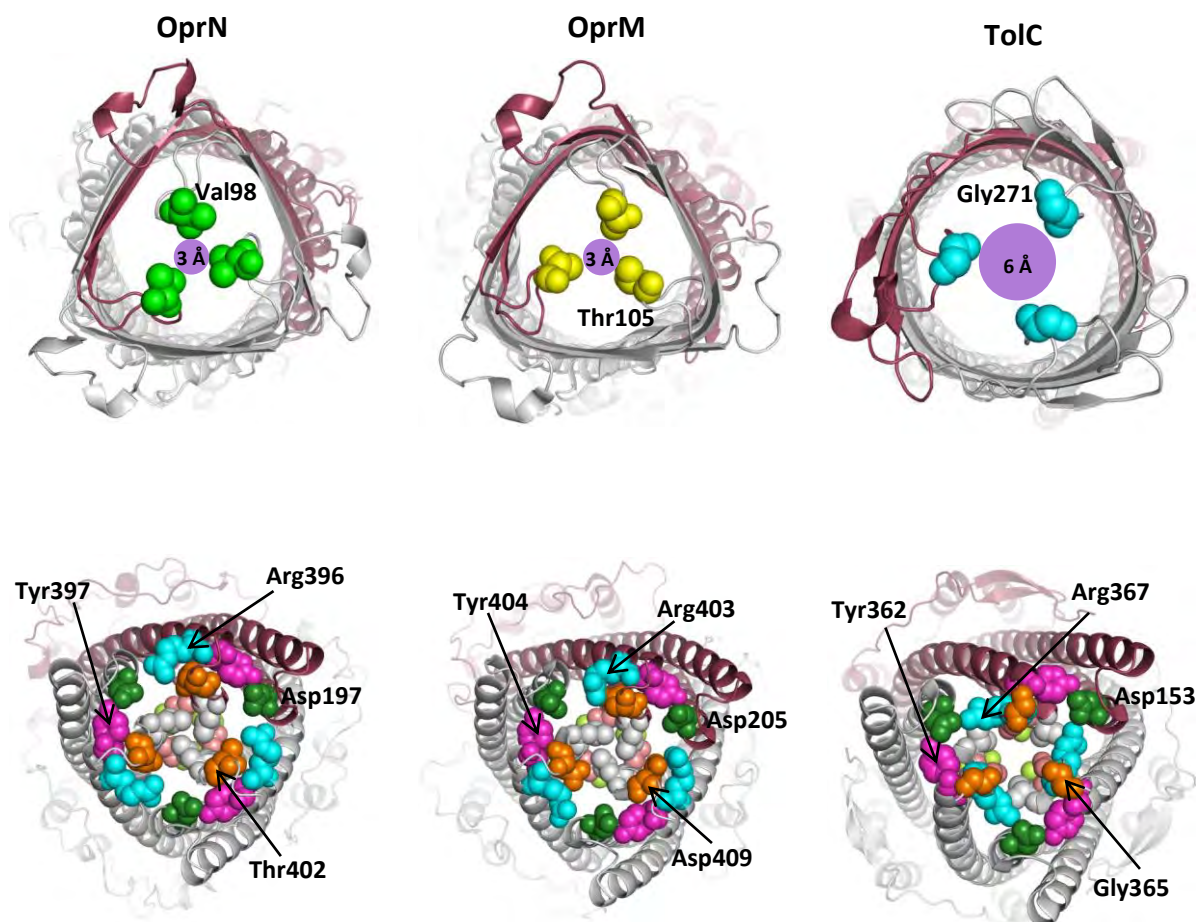


Figure 81 : Représentations des extrémités de différentes OMF. Les résidus impliqués dans la fermeture de l'extrémité extracellulaire (panneau supérieur) sont indiqués en vert pour OprN, en jaune pour OprM et en cyan pour TolC. Le cercle violet matérialise l'ouverture et le diamètre du pore formé par ces résidus. Le panneau inférieur montre les résidus impliqués dans la fermeture périplasmique. Les résidus impliqués dans le réseau de liaisons hydrogènes et de ponts salins inter- et intramonomériques qui stabilisent la conformation fermée sont représentés par des sphères. L'un des trois monomères est représenté en couleur briques.

Néanmoins, le niveau de constriction maximale est localisé à l'extrémité du canal, et implique pour les trois protéines considérées des résidus hydrophobes (**Fig. 82**). Chez OprM et OprN, cet acide aminé est conservé et correspond à une Leucine, là où une Valine est présente chez TolC.

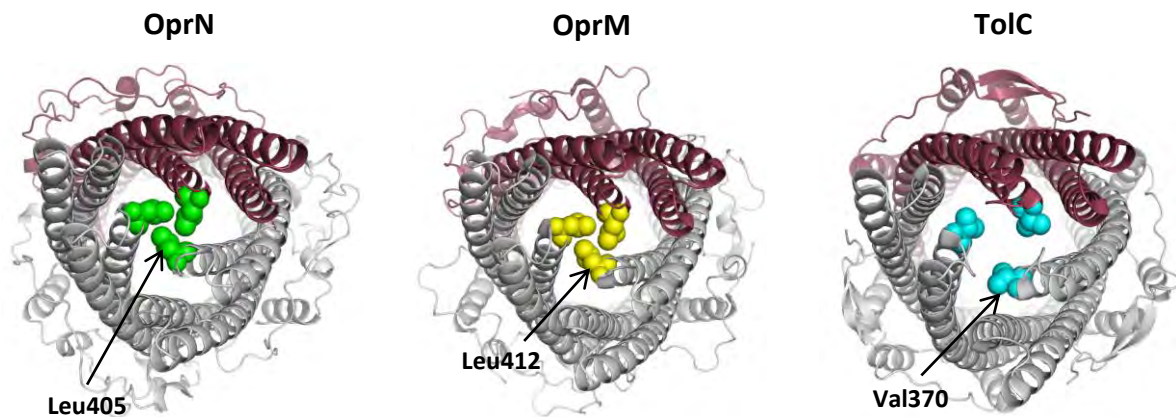


Figure 82 : Représentation du triplet de résidus hydrophobes conservés de la constriction périplasmique d'OprN, OprM et de TolC. L'un des monomères est représenté en couleur brique.

Il est à noter, grâce à des travaux réalisés par Anderson et al. (Andersen & al, 2002) sur TolC, que les résidus jouant un rôle important dans l'ouverture de TolC ne se limitent pas à ceux se trouvant à cette extrémité périplasmique, mais impliquent également des résidus localisés plus haut sur les hélices. En plus des résidus TolC-Asp153 et TolC-Tyr362 dont nous avons déjà parlé, qui forment une liaison hydrogène entre l'hélice externe H7 et l'hélice interne H4, ils ont identifié les résidus TolC-Gln136 et TolC-Glu359, formant une liaison hydrogène entre les hélices externes H3 et H7, comme acteur de l'ouverture. L'interaction Asp-Tyr est conservée chez OprN (**Fig. 83**) ce qui n'est pas le cas pour l'interaction Gln-Glu. Le résidu TolC-Gln136 est remplacé par OprN-Ser180 et le résidu TolC-Glu359 par OprN-Ala394, ne permettant pas la formation de cette liaison. Cette interaction est cependant maintenue chez son homologue OprM, qui conserve la liaison hydrogène grâce aux résidus OprM-Ser188 et OprM-Asp401. Chez OprN, cette interaction est assurée par les résidus Arg387-Asn173 (**Fig. 83**). Ces interactions entre les résidus de l'hélice internes H4 d'un monomère et l'hélice externe H7 du monomère voisin contribuent à stabiliser la conformation fermée.

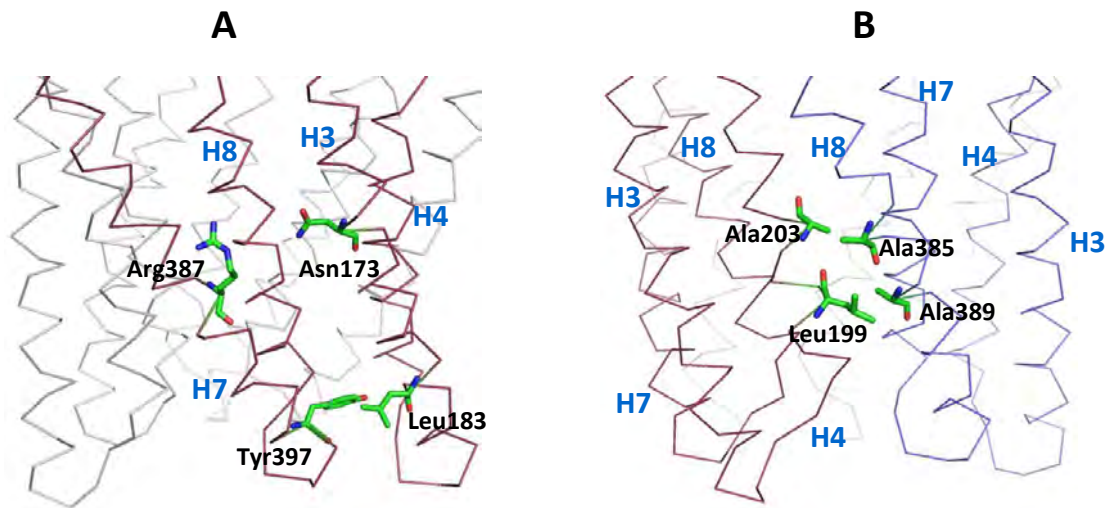


Figure 83 : Représentation des résidus qui stabilisent la conformation fermée chez OprN au sein d'un monomère (A) et entre deux monomères, représentés en marron et en bleu (B).

Les monomères d'OprN sont majoritairement stabilisés par des interactions hydrophobes dans cette région (Ala203 - Ala385, Leu199 - Ala389). Chez OprM, ces résidus correspondent à Thr211 - Ala392 et Arg207 - Tyr396. Le lien supérieur reste donc hydrophobe, mais l'interaction Leu-Ala n'est pas conservée. La conformation fermée d'OprN semble donc être stabilisée par des interactions différentes de celles observées chez ses homologues. Il sera intéressant de caractériser le rôle de l'ensemble de ces interactions pour étudier le mécanisme d'ouverture du canal.

Enfin, à l'extrémité interne du canal, un anneau anionique formé par les résidus Asp371 et Asp374 a été identifié chez TolC. Cet anneau a été décrit comme étant un filtre à cations au sein du canal au cours de l'efflux (voir **Chapitre I.4.1.2**). Cet anneau n'existe pas chez les protéines de *Pseudomonas* considérées, car même si le résidu TolC-Asp371 est conservé chez OprN (Asp409) et chez OprM (Asp416), le résidu TolC-Asp374 y est remplacé par une arginine (OprN-Arg412 et OprM-419) (**Fig. 84**). Les charges sont donc inversées, menant à la formation d'un pont salin à la place du filtre ionique de TolC, impliquant des différences de comportement dans les mécanismes d'ouverture de ces différentes protéines.

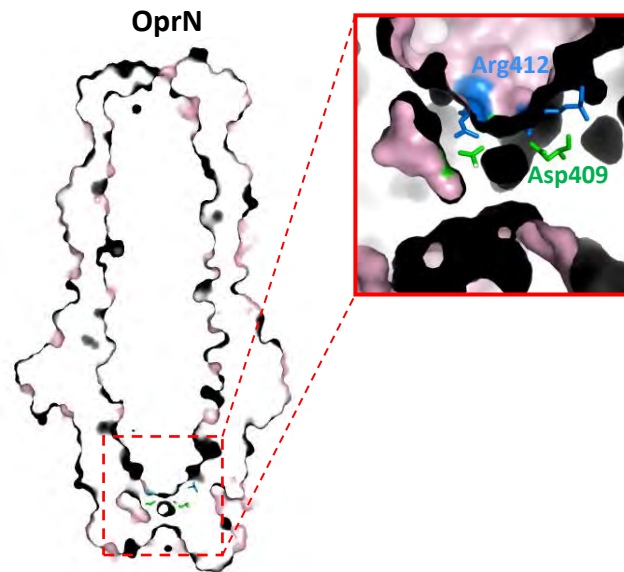


Figure 84 : Vue de la constriction périplasmique d'OprN.

Afin d'identifier les résidus réellement importants dans l'ouverture parmi ceux décrits dans ce chapitre, nous avons muté un certain nombre d'entre eux chez OprM, dont la structure avait été précédemment résolue (Phan & al, 2010) et étudié leur phénotype de résistance chez *Pseudomonas* par des expériences de complémentation qui seront décrites dans le **paragraphe 3**.

1.3.3. Comparaison du domaine équatorial des OMF

Le domaine équatorial correspond au domaine qui présente le plus de différences au sein des OMFs. Il est constitué d'une partie N-terminale, de l'extrémité C-terminale, et d'un segment central, correspondant respectivement aux régions 13-54, 440-447 et 231-265 chez OprN. Sur la **Figure 85** sont présentés les alignements de séquence de ces trois régions pour les protéines OprN, OprM et TolC. La grande variation au niveau de la longueur des séquences et de la nature des résidus dans cette région y apparait très clairement.

Chez OprN et OprM, l'extrémité N-terminale est plus longue de plus de 40 résidus par rapport à TolC, cette séquence permettant de couvrir la distance entre le domaine équatorial et la membrane externe, afin d'ajouter un ancrage supplémentaire à la membrane via le palmitate N-terminal (**Fig. 86A**). Côté C-terminal, à l'inverse la séquence de TolC est beaucoup plus longue que celle des autres protéines, 45 résidus de plus qu'OprM, et 59 de plus qu'OprN. Seule la structure d'OprN est complète, celle d'OprM s'arrêtant 11 résidus avant la fin et celle de TolC étant tronquée de 42 acides aminés, ne permettant donc pas de comparer précisément les trois structures dans cette région. Néanmoins, il est à noter que l'hélice α_9 présente au niveau de l'extrémité C-terminale de TolC se superpose à l'hélice α_1 d'OprM, également présente chez OprN, amenant l'extrémité C-terminale de TolC vers l'extrémité N-terminale des autres protéines (**Fig. 86B et 86C**). Cette hélice se poursuit par le brin β_6 , qui va former un feuillet avec un brin de la région centrale (β_3), correspondant à des segments sans structure secondaire dans les autres protéines (239-245 chez OprN). Il est intéressant de noter que la longueur du segment de structure inconnue dans la partie C-terminale de TolC est de longueur équivalente à la longue région N-terminale d'OprM et OprN. Il pourrait donc être envisagé que cette séquence ait également pour fonction de raccrocher la protéine à la membrane, même si aucun site de prédiction n'a proposé de modification lipidique pouvant jouer ce rôle sur ce fragment de séquence.

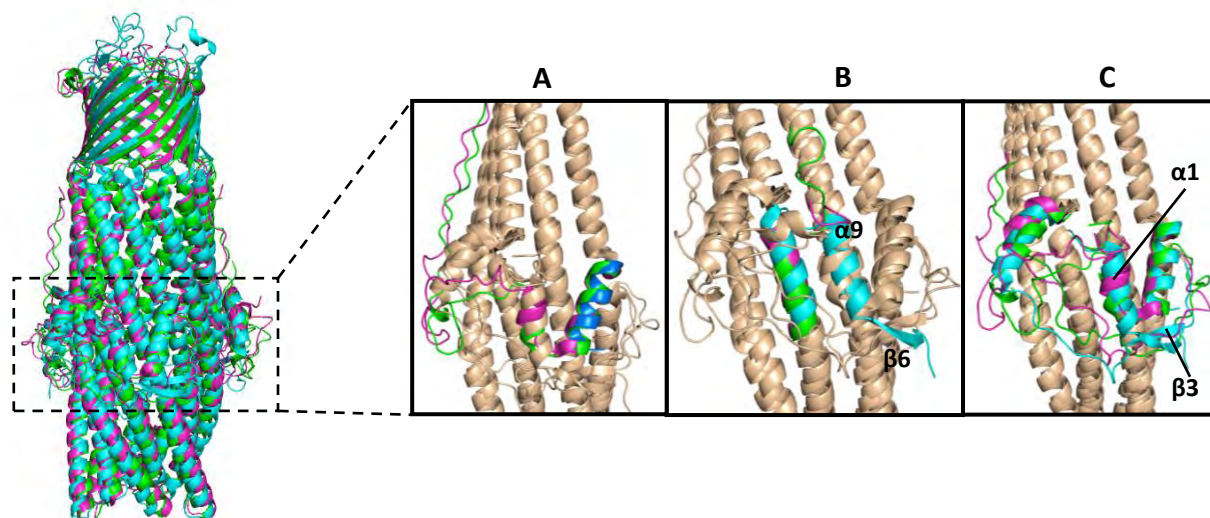


Figure 86 : Superposition des extrémités N-terminale (A), C-terminale (B) et centrale (C) d'OprN, d'OprM et de TolC. La structure correspondant à OprN est représentée en vert, celle d'OprM en rose et celle de TolC en cyan. L'hélice $\alpha 9$ C-terminale de TolC (B, en cyan) se superpose à l'hélice $\alpha 1$ N-terminale d'OprN (C, en vert) et OprM (C, en magenta). TolC possède un feuillet supplémentaire β formé par les brins $\beta 6$ (B, en cyan) et $\beta 3$ (C, en cyan).

Le reste de la région équatoriale est majoritairement non structurée et constituée de boucles flexibles. Cette région ayant été décrite comme étant impliquée dans l'interaction de l'OMF avec son partenaire MFP, les différences observées pourraient refléter les interactions structurales qui contribuent à la stabilisation et à la spécificité de l'interaction avec le partenaire MFP.

1.3.4. Propriétés électrostatiques des OMF

La spécificité de substrats des pompes d'efflux tripartites a été décrite comme étant dépendante du transporteur RND. Au cours de l'efflux, le substrat pris en charge par le transporteur RND doit pouvoir être expulsé à travers le canal. L'analyse du potentiel électrostatique de surface d'OprN, d'OprM et de TolC montre que ces canaux présentent une répartition variable des charges à l'extérieur du canal, en dehors de la zone en contact

avec la surface cytoplasmique de la membrane externe, plutôt chargée positivement (**Fig. 87**). Ils présentent cependant une cavité interne majoritairement électro négative, avec des variations d'une OMF à l'autre. OprN et TolC présentent une densité de charges négatives plus importante au niveau de la partie supérieure du canal, notamment au niveau du domaine β transmembranaire et de la région adjacente, contrairement à OprM dont les charges négatives sont réparties de façon uniforme le long du canal (**Fig. 87**).

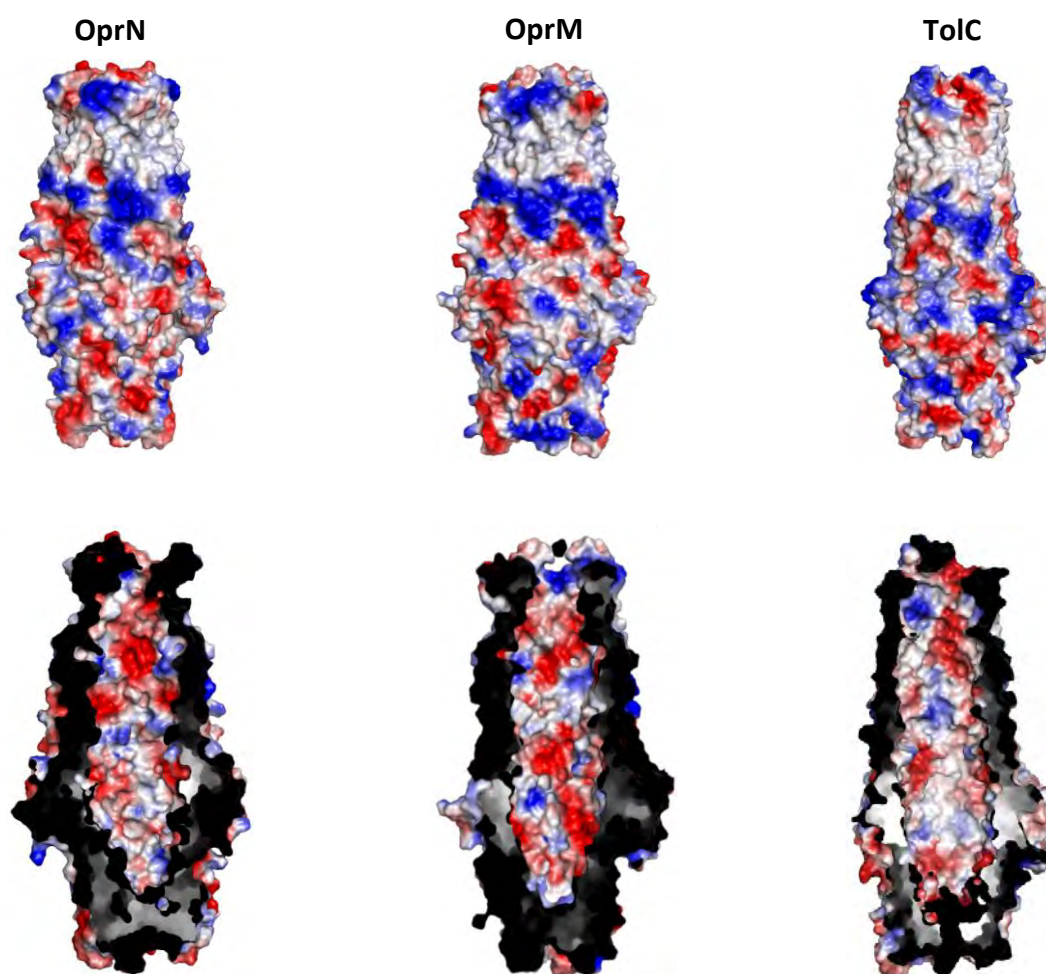


Figure 87 : Distribution électrostatique des charges à la surface d'OprN, d'OprM et de TolC. Les charges positives sont représentées en bleu, les charges négatives en rouge, et les régions neutres en blanc. La répartition des charges a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol.

On note que l'efflux des quinolones est majoritairement pris en charge par les pompes OprN-MexEF et OprJ-MexCD chez *P. aeruginosa*, même s'ils sont également des substrats de la pompe OprM-MexAB. Il a été montré que la pompe OprN-MexEF efflue préférentiellement des quinolones dépourvues d'atome de fluor, les fluoroquinolones étant préférentiellement prises en charge par la pompe OprJ-MexCD. Or, la structure du canal OprJ, résolue récemment par le groupe de Yonehara & al (code PDB 5AZS) montre une répartition interne des charges négatives équivalente à celle d'OprM au niveau du domaine transmembranaire et de la région adjacente (Yonehara & al, 2016). La répartition des charges d'OprN pourrait donc expliquer cette différence car la présence d'un atome de fluor électronégatif pourrait entraîner une répulsion électrostatique au contact des résidus de la région dont la densité de charges négatives est importante, contribuant ainsi à ralentir la diffusion du substrat à travers le canal. Cette différence de répartition des charges négatives à l'intérieur du canal pourrait donc expliquer la différence de spécificité de chacune de ces OMFs pour leurs substrats.

1.3.5. Acylation de l'extrémité N-terminale

L'extrémité N-terminale des OMF chez *P. aeruginosa* est constituée d'une longue boucle qui s'étend du domaine équatorial vers la membrane interne. Le premier résidu de la plupart de ces protéines est une cystéine et les structures cristallographiques montrent que ce résidu est covalamment lié à un groupement acyl ancré à la membrane interne. Cette cystéine a été décrite comme étant impliquée dans l'interaction de la protéine avec la membrane ainsi que dans son insertion dans la membrane externe. Il a en effet été montré que la mutation de cette cystéine chez CusC d'*E. coli* affecte le repliement du domaine β transmembranaire, empêchant ainsi son insertion dans la membrane externe (Lei & al, 2014). De plus, d'autres résultats ont montré que la délipidation d'OprM entraîne une accumulation de la protéine dans le périplasme (Nakajima & al, 2000). Les OMFs présentent donc pour la plupart deux modes d'interaction avec la membrane : l'ancrage grâce au groupement acyle et l'insertion grâce au domaine β transmembranaire.

Dans les structures cristallographiques d'OprM et de CusC, la présence de densité électronique a permis de modéliser cette queue lipidique de façon partielle. Ce groupement est covalamment lié à l'atome de soufre de la cystéine N-terminale grâce à une liaison thioester chez OprM (S-acyl). Chez CusC, la protéine est triacylée avec un groupement acyle lié à l'amine libre de la cystéine N-terminale (N-acyl) et un groupement diacyl au niveau du groupement thiol (S-diacyl) de la cystéine. Dans notre structure d'OprN (**Fig. 88**), la densité visible indique la présence de deux groupements acyl (N-acyl et S-acyl). De la densité résiduelle est observée au niveau du groupement carboxyle libre du S-acyl, qui peut correspondre soit à la présence d'un troisième groupement acyl, soit à une conformation alternée de la chaîne carbonée, cette modification lipidique étant très flexible. OprN pourrait donc être triacylée contrairement à OprM dont la structure ne présente qu'un groupement acyle.

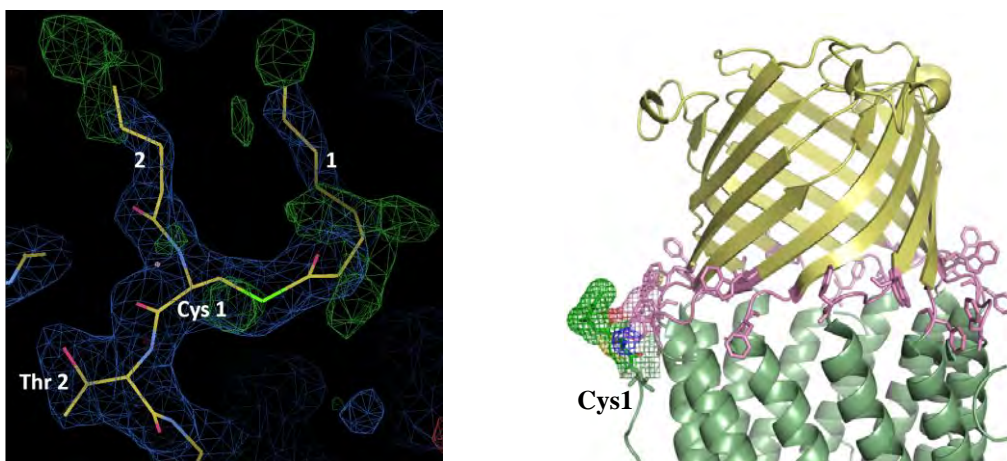


Figure 88 : Vue de l'extrémité N-terminale d'OprN. La carte de densité électronique (à gauche) montre la présence de deux groupements acyle au niveau de l'amine libre et du groupement thiol de la cystéine N-terminale. L'ancre lipidique est située au niveau de la ceinture aromatique (en rose) qui délimite l'interface correspondant à la couche cytoplasmique de la membrane externe (figure de droite). Le domaine transmembranaire β est représenté en jaune et les hélices du domaine α en vert.

Les raisons de l'acylation de certaines OMFs telles qu'OprN ou CusC demeurent indéterminées, notamment à cause de l'absence d'acylation de TolC. Les enzymes

responsables de l'acylation chez les bactéries Gram négatif, notamment la diacyltransférase, reconnaissent une séquence consensus (Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys) appelée « lipobox » située en amont de la cystéine N-terminale au niveau de la séquence signal et qui inclut cette cystéine. Cette lipobox, présente chez OprM (LSGC) et chez OprN (LSAC) est absente chez TolC. De plus, l'insertion et le repliement des protéines membranaires organisées en tonneaux β dans la membrane externe impliquent la machinerie d'assemblage BAM. L'ancre lipidique a été décrite comme étant nécessaire à l'insertion et au bon repliement des OMFs dans la membrane externe. Or, il se trouve que le repliement et l'insertion médiée par le complexe BAM est indépendante de la présence d'un groupement acyle. L'absence d'acylation de TolC implique donc la prise en charge de son insertion dans la membrane par le complexe BAM. Elle suggère également d'autres fonctions de l'ancre lipidique, au-delà de son rôle d'insertion dans la membrane externe.

La question du nombre de groupement acyl reste également un sujet de débat. OprM, CusC et OprN ont des structures similaires, ce qui pourrait impliquer une modification similaire de l'extrémité N-terminale. Les lipoprotéines sont acylées au cours de trois étapes et l'addition des groupements acyl implique deux protéines, une diacyltransférase et une transacylase (voir **Chapitre I.4**). La 1^{ère} catalyse le transfert d'un groupement diacyl au niveau du groupement thiol (S-diacyl) de la cystéine N-terminale. Le groupement acyle présent dans la structure d'OprM est situé au niveau de ce groupement. Le mode de fonctionnement de la diacyltransférase suggère donc la présence d'un second groupement acyle. La présence d'un troisième groupement acyle, ajouté grâce à la transacylase n'est cependant pas certaine, comme cela est décrit plus loin. Le système de translocation Lol est un système qui permet le transfert des lipoprotéines de la membrane interne vers la membrane externe et l'insertion de l'ancre lipidique dans la membrane externe. Ce système interagit avec le groupement acyl des lipoprotéines et il a longtemps été décrit comme interagissant uniquement avec des protéines triacylées. Il a cependant été montré récemment que les lipoprotéines sont adressées à la membrane externe chez des mutants de *Francisella tularensis* délétés de la transacylase, suggérant ainsi que la triacylation n'est pas nécessaire à la reconnaissance par le système Lol (Chahales & Thanassi, 2015). Ces résultats suggèrent donc que les OMFs sont au minimum diacylées voire triacylées, mais qu'il est moins probable qu'elles soient monoacylées.

Chez OprN, la densité électronique est faible au niveau de cette région et ne permet donc pas de déterminer la nature exacte du groupement acyle. Chez OprM, cette modification post-traductionnelle a été analysée par Monlezun & al (Monlezun & al, 2015) grâce à des sondes chimiques et à la résolution d'une nouvelle structure cristallographique d'OprM dans un autre groupe d'espace (code PDB 4Y1K) (voir article, **page 183**). Afin d'analyser l'occupation des groupements thiol et amine de la cystéine N-terminale d'OprM, ces groupements ont été marqués à l'aide de deux fluorophores, le N-(2-methanethiosulfonylethyl)-7-methoxycoumarin-4-acetamide (MTS-EMCA) qui devient fluorescent en se liant de façon covalente à la cystéine grâce à un pont disulfure et le 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), qui devient fluorescent en se liant à l'amine libre N-terminale des protéines et dans des conditions spécifiques, à celle des lysines. L'analyse des protéines sur gel après exposition aux UV à 475 nm pour le NBD-Cl montre que l'amine libre de la cystéine N-terminale d'OprM est accessible, car on observe la présence d'une bande fluorescente, ce qui suggère que la cystéine n'est pas acylée au niveau de ce groupement. La même expérience, réalisée à 312 nm pour révéler le MTS-EMCA montre par ailleurs que le groupement thiol n'est pas libre. On n'observe donc pas de bande fluorescente pour OprM, contrairement à MexA non-palmitoylée, pour laquelle la séquence signal a été ôtée tout en conservant la cystéine et qui a été utilisée comme contrôle. Cela confirme que la cystéine est acylée au niveau de ce groupement (**Fig. 89**).

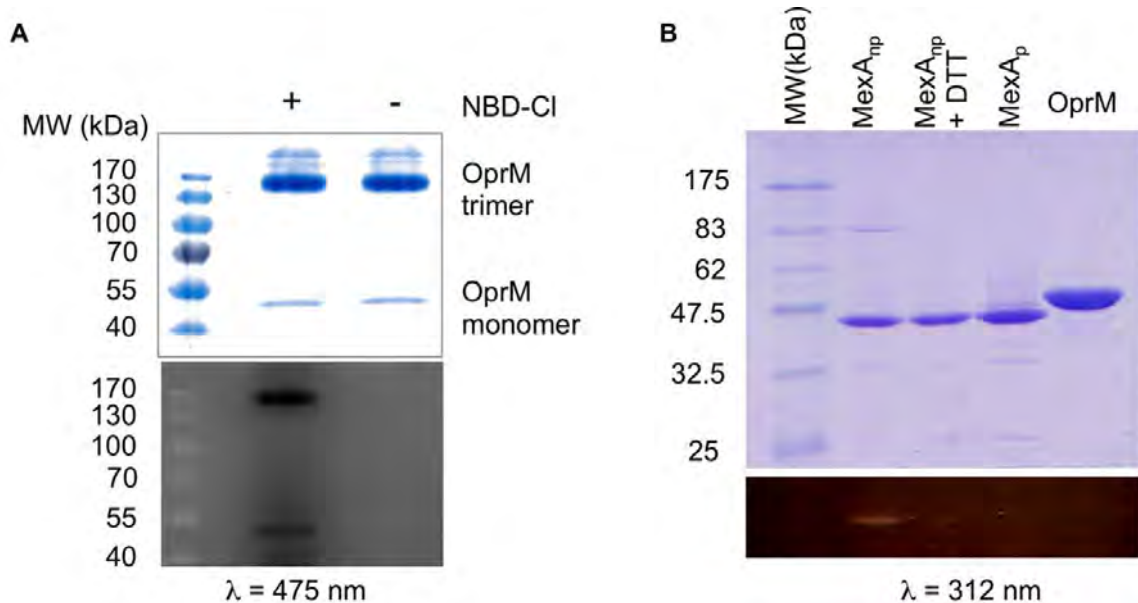


Figure 89 : Analyse chimique de l'extrémité N-terminale d'OprM. Les protéines ont été analysées en absence ou en présence de NBD-Cl (A) et en présence de MTS-EMCA (B). Le panneau supérieur correspond aux gels colorés au bleu de Coomassie et le panneau inférieur, aux gels exposés aux UV, aux longueurs d'onde correspondant à chacun des fluorophores. Différentes formes de MexA servent de contrôle, la forme acylée (MexA_p), la forme soluble non acylée avec la cystéine N-terminale libre (MexA_{np}) seule ou en présence de DTT. (Adapté de Monlezun & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

Par ailleurs, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée mais elle n'a pas permis de déterminer la nature du groupement acyle, l'extrémité N-terminale n'étant pas détectée malgré différents essais de protéases, semblant indiquer que ce fragment n'arrive pas à voler dans le spectromètre, bien que sa nature ne soit pas entièrement hydrophobe. La structure cristallographique d'OprM, résolue dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ à 2,4 Å de résolution montrait uniquement le début de l'extrémité N-terminale. Une nouvelle structure cristallographique d'OprM a été résolue dans un groupe d'espace différent (C2). Ce groupe d'espace présente un empilement plus serré au niveau d'un des monomères, qui contribue à stabiliser son extrémité N-terminale. Cette nouvelle structure montre un mono-acyl, soit un palmitate. Ce groupement présente deux orientations au sein du cristal et l'interaction des palmitates de deux trimères en « tête-bêche » contribue à stabiliser l'extrémité N-terminale au sein du cristal (Fig. 90).

Afin de déterminer le rôle de cette ancre lipidique dans l'adressage à la membrane et dans le fonctionnement du canal, nous avons réalisé des tests de sensibilité aux antibiotiques par complémentation *in vivo*, à l'aide de souches de *P. aeruginosa* délétées du gène codant pour OprM et transformées à l'aide de vecteurs portant la forme sauvage du canal OprM ou la forme OprM (C18) mutée au niveau de la cystéine N-terminale. Les mutants testés ne permettent pas de restaurer la résistance.

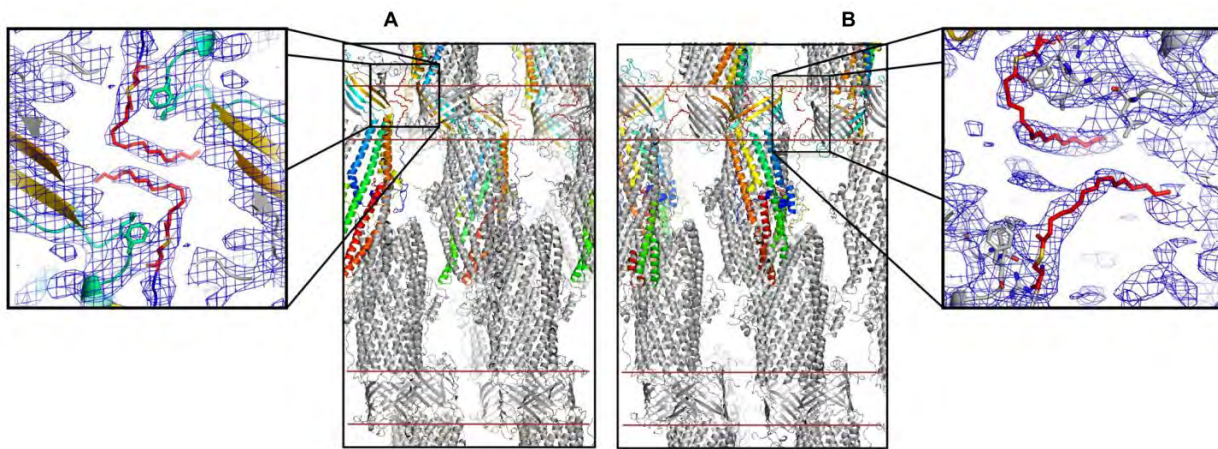


Figure 90 : Empilement cristallin d'OprM dans le groupe d'espace C2. Les vues élargies montrent les interactions entre le palmitate des monomères A (A), et les interactions entre le B et le C (B). (Adapté de Monlezun & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

New OprM structure highlighting the nature of the N-terminal anchor

Laura Monlezun^{1†}, Gilles Phan¹, Houssain Benabdelhak², Marie-Bernard Lascombe¹, Véronique Y. N. Enguéné¹, Martin Picard¹ and Isabelle Broutin^{1*}

¹ Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, CNRS UMR 8015, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France, ² Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, CNRS UMR 7371, INSERM U1146, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Attilio Vittorio Vargiu,
Università di Cagliari, Italy

Reviewed by:

Ashima Kushwaha Bhardwaj,
Indian Institute of Advanced
Research, India
Satoshi Murakami,
Tokyo Institute of Technology, Japan

*Correspondence:

Isabelle Broutin,
Laboratoire de Cristallographie et
RMN Biologiques, CNRS UMR 8015,
Faculté de Pharmacie, Université
Paris Descartes, 4 Avenue
de l'Observatoire, 75270 Paris
Cedex 06, France
isabelle.broutin@parisdescartes.fr

†Present address:

Laura Monlezun,
Division of Molecular Microbiology,
College of Life Sciences, University
of Dundee, Dow Street, Dundee DD1
5EH, UK

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 10 February 2015

Accepted: 19 June 2015

Published: 01 July 2015

Citation:

Monlezun L, Phan G, Benabdelhak H,
Lascombe M-B, Enguéné VYN,
Picard M and Broutin I (2015) New
OprM structure highlighting the nature
of the N-terminal anchor.
Front. Microbiol. 6:667.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00667

Among the different mechanisms used by bacteria to resist antibiotics, active efflux plays a major role. In Gram-negative bacteria, active efflux is carried out by tripartite efflux pumps that form a macromolecular assembly spanning both membranes of the cellular wall. At the outer membrane level, a well-conserved outer membrane factor (OMF) protein acts as an exit duct, but its sequence varies greatly among different species. The OMFs share a similar tri-dimensional structure that includes a beta-barrel pore domain that stabilizes the channel within the membrane. In addition, OMFs are often subjected to different N-terminal post-translational modifications (PTMs), such as an acylation with a lipid. The role of additional N-terminal anchors is all the more intriguing since it is not always required among the OMFs family. Understanding this optional PTM could open new research lines in the field of antibiotics resistance. In *Escherichia coli*, it has been shown that CusC is modified with a tri-acylated lipid, whereas TolC does not show any modification. In the case of OprM from *Pseudomonas aeruginosa*, the N-terminal modification remains a matter of debate, therefore, we used several approaches to investigate this issue. As definitive evidence, we present a new X-ray structure at 3.8 Å resolution that was solved in a new space group, making it possible to model the N-terminal residue as a palmitoylated cysteine.

Keywords: multidrug resistance, efflux pump, membrane protein, post-translational modification, lipoyl, X-ray structure

Introduction

After several decades of continuous antibiotic therapy success, we are now facing the appearance of multi-drug resistant strains and the near absence of new antibiotic family development for more than 10 years (Fischbach and Walsh, 2009; Hede, 2014). These facts highlight the need for new anti-infection strategies (Walsh, 2003; Olivares et al., 2013), although a promising compound isolated from natural soil bacteria that is able to kill Gram-positive pathogens, was recently reported (Ling et al., 2015). Among the most virulent nosocomial pathogens are *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, and *Acinetobacter baumannii* (Poole, 2004; Lister et al., 2009; Bereket et al., 2012; Bayram et al., 2013). These strains have developed several resistance strategies including active efflux pumps (Cattoir, 2004; Li and Nikaido, 2009; Nikaido, 2009; Nikaido and Pages, 2012). In Gram-negative bacteria efflux pumps are multimers of three

Abbreviations: βOG, beta-octyl glucopyranoside; DDM, dodecyl maltoside; MexAp, MexA palmitoylated; MexAnp, MexA non palmitoylated; PTM, posttranslational modification.

different proteins that form a long transmembrane scaffold linking the cytoplasm to the outside of the cell (Nikaido and Pages, 2012). These tripartite assemblies are composed of an inner membrane protein from the RND (Resistance Nodulation cell Division) family, which corresponds to the pumping motor that uses the proton-gradient as an energy source; an outer membrane channel from the OMF (Outer Membrane Factor) family; and a periplasmic protein from the MFP (membrane fusion protein) family, anchored to the inner membrane and connecting the other two proteins. In *P. aeruginosa*, up to 12 different pumps have been sequenced (Yen et al., 2002), including OprM_{OMF}-MexA_{MFP}-MexB_{RND} which is one of the most studied pumps because of its constitutive expression whereas the others appear under antibiotic pressure (Li and Poole, 2001; Nakajima et al., 2002; Schweizer, 2003). This study will focus on the versatile membrane channel OprM, which has the ability to work with at least four different pumps, including OprM-MexAB, OprM-MexXY (Aires et al., 1999; Morita et al., 2012), OprM-MexJK (Chuanchien et al., 2002), and OprM-MexMN (Mima et al., 2005).

The X-ray structure of OprM was solved in two different space groups showing its trimeric nature [Protein Data Bank (PDB) code: 1WP1 (Akama et al., 2004); 3D5K (Phan et al., 2010)]. The architecture of OprM is composed of a beta-barrel domain that is ~40 Å in height spanning the outer membrane and a periplasmic alpha-helical domain that is ~100 Å in length and bears a central buoy. Most of the structure has been determined with the exception of the eleven C-terminal amino acids, which are not visible in the electronic density maps of both structures. In addition, the structure of the post-translational modification (PTM) that covalently links the Cys-terminal residue to a lipoyl has never been properly characterized at any resolution, despite palmitoylation being suggested some time ago (Nakajima et al., 2000). This lipoyl modification is not commonly shared among OMF family members. For instance, the *E. coli* homolog TolC (PDB code: 1EK9, Koronakis et al., 2000), has an N-terminus that is 44 residues shorter and does not begin with a cysteine. Other OMFs with known structures, such as VceC from *Vibrio cholerae* (PDB code: 1YC9, Federici et al., 2005), CusC of the metal effluent pump from *E. coli* (3PIK, Kulathila et al., 2011; 4K7R, Lei et al., 2014a) and CmeC from *E. coli* (4MT4, Su et al., 2014) begin with residues Cys-Ser (Figure 1; Supplementary Figure S1) like OprM. The OMF protein with the most recently solved structure, MtrE (4MT0, Lei et al., 2014b) from *Neisseria gonorrhoeae*, begins with Cys-Thr. The structure of CusC indicates the presence of a di-acylated thiol on the N-terminal cysteine, with or without a supplementary acyl chain on the N-terminal amine (tri-acylation), depending on the protomer. As the CusC sequence is highly similar to OprM, it has been suggested that the latter may be modified in a similar manner, rather than with only one palmitoyl chain attached by a thio-acyl bound to the N-terminal Cys as previously described (Kulathila et al., 2011). Di-acylation is also found in CmeC, but nothing has been found to be added to the N-terminal cysteine of the MtrE structure. In the VceC structure, the protein sequence was cloned without the first 12 amino acids, therefore, the N-terminal cysteine was not present. In the OprM structure solved in the R32 space group (Akama

et al., 2004), the three monomers were found to be identical by the threefold crystallographic symmetry axis, and despite a resolution of 2.6 Å there was no evidence of lipidation to the thiol or amine of the N-terminal cysteine. The same observation applies to the OprM structure solved at 2.4 Å of resolution (Phan et al., 2010) in which the P₂1₂1₂1 space group does not stabilize sufficiently the N-terminal modified cysteine.

Consequently, the N-terminal modification of OMFs remains an open question. Post-translational lipidation is particularly essential for the secretion and localization of some membranous proteins, a process involving different biological modifiers such as palmitoyl acyl transferases (Aicart-Ramos et al., 2011), palmitoyl thioesterases, lipoprotein diacylglycerol transferase or lipoprotein N-acyl transferase (Linder and Deschenes, 2007; Kovacs-Simon et al., 2011; Nakayama et al., 2012). These modifying enzymes could potentially lead to new therapeutic targets. In addition, it is not known why some OMF proteins need to undergo PTM in addition to their *trans*-membrane beta-barrel insertion, or what is the nature of this modification. We asked this question using OprM from *P. aeruginosa* with specific N-terminal chemical probes to investigate whether it is actually palmitoylated via a thio-acyl or subjected to other PTMs, and resolved a new OprM structure in a new crystallographic space group.

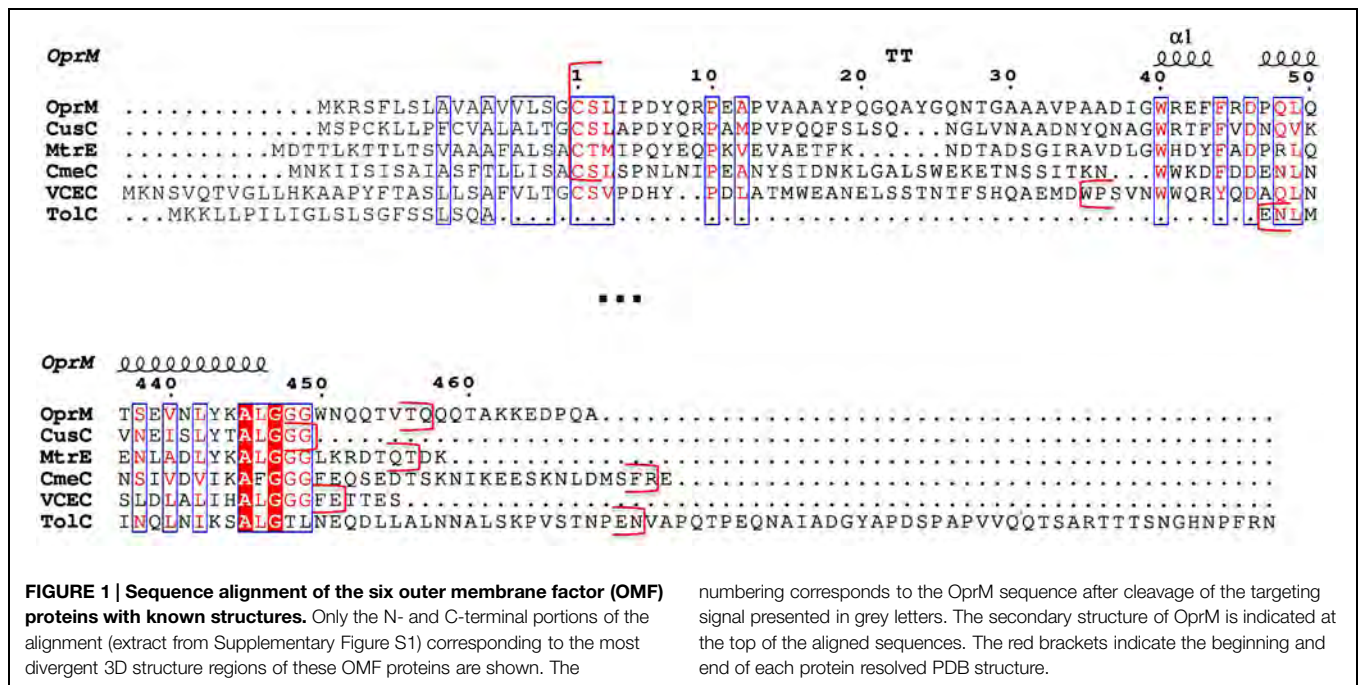
Materials and Methods

Expression and Purification of OprM, MexAp, and MexAnp

The three proteins were produced following the protocol described by Phan et al. (2010) and Ferrandez et al. (2012) with some modifications. The protein genes were inserted into the pBAD33-GFPuv plasmid with a C-terminal 6-histidines tag and the N-terminus extremity being dedicated to the signal peptide. For the non-palmitoylated form of MexA (MexAnp), the signal peptide was deleted from the construct, resulting in a non-membranous protein bearing a free N-terminal cysteine. Wt MexA has the same amino acid sequence as MexAnp, but its starting cysteine is palmitoylated after maturation (MexAp).

The plasmids were transformed into the C43-DE3 *E. coli* strain (Miroux and Walker, 1996). For each protein 6 L of cultures were grown; they were begun at OD₆₀₀ = 0.05 from dilution of an overnight pre-culture at 37°C in LB medium containing 25 µg/ml chloramphenicol, and were then grown at 30°C. Cells were induced at OD₆₀₀ = 0.6–0.8 by the addition of 0.02% L-arabinose and grown for 2 h before centrifugation for 20 min at 9,000 g. The cell pellet was resuspended in 45 ml of buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 1 µl/ml cocktail of anti-protease inhibitors set III (Calbiochem) and 50 units of benzonase (Promega).

Cells were broken using a French pressure cell at 69 MPa and then centrifuged twice for 30 min at 8,500 g to remove inclusion bodies and unbroken cells. As for OprM, the supernatant was applied to a sucrose step gradient (0.5 and 1.5 M) and then centrifuged for 3 h at 200,000 g at 4°C for membrane separation. The pellet, corresponding to the outer membrane fraction, was



re-suspended in a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol (v/v) and 2% βOG (w/v) (Anatrace) and then stirred overnight at 23°C. The solubilized membrane proteins were recovered by centrifugation for 30 min at 50,000 g. For MexAp, the lysis supernatant was directly centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C, and the pellet was resuspended in a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol (v/v), 2% βOG (w/v) (Anatrace) 0.2% *N*-lauryl sarkosyl, and 15 mM imidazole, then stirred overnight at 23°C. The solubilized membrane proteins were recovered by centrifugation at 4°C for 1 h at 100,000 g. For MexAnp, because it is produced directly in the cytoplasm, there is no need for a detergent solubilization step. After lysis and centrifugation, 15 mM imidazole was added to the supernatant before loading onto the column. For the three proteins, the same protocol was then used. The proteins were loaded onto a Ni-NTA resin column pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 10% glycerol (v/v), 15 mM imidazole for MexAnp, the same buffer plus 0.9% βOG (w/v) for OprM, and the addition of 0.2% *N*-lauryl sarkosyl for MexAp. After washing of the column, the proteins were eluted in the same respective buffers containing 300 mM imidazole, and then desalted using a PD-10 desalting column (GE) to remove the imidazole. MexAp and MexAnp were concentrated up to 2.5 mg/ml. OprM was concentrated up to 8 mg/ml using the 30-kDa cutoff Amicon system (Millipore).

Labeling of the N-Terminal Amine

The fluorescent compound 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) is a fluorogenic reagent that reacts with protein N-terminal amines but not with lysines in the conditions used as their respective pKa largely differ (Ghosh and Whitehouse, 1968; Bernal-Perez et al., 2012). A NBD-Cl stock solution was prepared in DMSO (dimethylsulfoxide) and 6 μM of OprM in 50 mM

Hepes buffer (pH 7.5) and 0.05% DDM (w/v) containing 1 mM EDTA was mixed with 0.5 mM of NBD-Cl at 4°C. After 6 h the reaction was stopped by adding SDS-PAGE loading buffer [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0.1% bromophenol blue (w/v)] and the solution was deposited on an SDS gel together with unmarked OprM protein. The gel was analyzed for fluorescence using a UV transilluminator at an emission wavelength of 504 nm. A clear band was visualized for the labeled OprM.

Labeling of the N-Terminal Cysteine Sulfur

The fluorescent compound MTS-EMCA [*N*-(2-Methanethiosulfonylethyl)-7-methoxycoumarin-4-acetamide, Toronto Research, Chemicals Inc.] is a sulfhydryl active reagent that covalently attaches to the reduced cysteine via a disulfide bond. 25 mM proteins (MexAp, MexAnp, and OprM) were incubated for 2 h with 2 mM MTS-EMCA in 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, βOG 1% (w/v), at room temperature away from light. Reactions were stopped by adding an equivalent volume of SDS-PAGE loading buffer. After electrophoresis, gels were visualized with a UV transilluminator at 312 nm before coomassie blue staining. MTS-EMCA fluorescence appeared for the labeled proteins.

Crystallization and Data Collection

OprM crystals were grown by vapor diffusion using the hanging drop method. Two different crystal forms were obtained, both leading to the recording of a diffraction dataset after 100s of crystal tests on the different beam lines of both SOLEIL and ESRF synchrotrons. One crystal was obtained in a 1 M sodium citrate (pH 5-6) precipitation solution and was found to belong to the P2₁2₁2₁ space group. The structure in this space group has been previously published (Phan et al., 2010). The second

crystal was obtained in 100 mM sodium acetate (pH 4.5), 6% PEG 20 000 (w/v), 300 mM ammonium citrate, 25–30% glycerol (v/v), and 0.9% β OG (w/v). These rhombohedral crystals (100 μ m \times 100 μ m \times 30 μ m) belong to the C2 space group and diffracted to 3.8 Å resolution. A complete dataset was collected on beamline ID29 (ESRF, Grenoble) with an exposure time of 10 s per degree of oscillation. Owing to its low resolution, this data set has been kept for a long time without solving the structure, but the recent question of the N-terminal modification nature prompted us to ultimately solve the OprM structure in the C2 space group.

Data processing, Model Building, and Refinement

Reflections were integrated, scaled and reduced using the programs XDS (Kabsch, 1993) and TRUNCATE from the CCP4 suite (1994). Data collection statistics are summarized in **Table 1**.

We have solved the C2 structure of OprM by molecular replacement with PHASER (McCoy et al., 2007) in automatic mode using our previously solved structure (PDB code 3D5K, Phan et al., 2010) as a model. Refinements were conducted using Phenix (Adams et al., 2002) and the protein was rebuilt with COOT (Emsley and Cowtan, 2004). The Bfactors were refined

by groups. These groups were determined after a refinement step using the two Bfactors per residues option, but the resulting structure was not kept for the continuation. The TLS option was not used.

The last 19 C-terminal residues could not be assigned, probably due to the large flexibility of this region. The validity of our model was checked using MolProbity (Davis et al., 2007) and the polygon tool (Urzhumtseva et al., 2009) from Phenix (see Supplementary Figure S3). The OprM structure model of the C2 crystal was deposited in the PDB (4Y1K).

Figures were created with Pymol (DeLano, 2002).

Sequence Alignment

Sequence alignment of the different OMF proteins whose structures were deposited in the PDB was performed using the program MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation)¹. The alignment was submitted to ESPript 3.0 (Robert and Gouet, 2014) for customization.

Results

Chemical Analysis of the Lipoyl Position

Among the different PTMs that can occur on an N-terminal cysteine (Chalker et al., 2009) N- or S-palmitoylation or acetylation are readily observed (Resh, 1999; Tooley and Schaner Tooley, 2014). As these different modifications are regulated by specific transferases, it is important to characterize the exact nature of OprM PTM. Thus, two questions needed to be clarified: what is the chemical nature of the modification, and which group of the amino acid is modified? To address these two questions, two different types of chemical labeling were performed on purified OprM. To analyze the occupancy of the N-terminal amine, this protein was labeled with the fluorogenic molecule 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) at neutral pH. This molecule has been proven to be a specific probe for the N-terminal amine only (Bernal-Perez et al., 2012). After incubation with NBD-Cl, the protein was analyzed on an SDS gel, revealing a bright fluorescent band when exposed at 475 nm (**Figure 2A**), thus showing that the N-terminal amine of OprM is actually accessible.

Following the same approach, a different probe was used to verify the occupancy of the sulfhydryl group of the cysteine. The fluorescent compound MTS-EMCA, which specifically links to this group, was used to label OprM. As a control we also analyzed MexAp (wt palmitoylated MexA), MexAnp (a mutated form of MexA lacking the signal peptide and bearing a free N-terminal cysteine) and MexAnp in the presence of DTT to reverse thiol acylation. After migration on an SDS gel, UV exposure of the gel at 312 nm (**Figure 2B**, lower panel) revealed a bright band for MexAnp and a faint band for MexAnp with DTT but no signal for OprM, demonstrating that the N-terminal cysteine of OprM is occupied on its thiol by lipoyl modification. Therefore, it can be concluded that the lipoyl modification is anchored exclusively to the sulfhydryl group of OprM.

TABLE 1 | Crystallographic data and refinement statistics.

Data collection	
Beamline	ESRF ID29
X-ray wavelength (Å)	1.0052
Crystal – detector distance (mm)	400
Space group	C2
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	152.6, 87.9, 355.9
α , β , γ (°)	90, 98.9, 90
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	3.80
Solvent content (%)	67.7
Resolution (Å) ^a	87.9 – 3.8 (3.9–3.8)
Number of reflections	131 301
Number of unique reflections	40 566 (3571)
R_{merge} (%) ^{a,b}	12.2 (31.2)
Completeness (%) ^a	87.7 (77.9)
Redundancy ^a	3.2 (3.3)
I/σ ^a	8.5 (3.3)
Refinement	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%) ^{c,d}	29.7/34.6
Number of residues	2 741
Number of solvent molecules	0
Rmsd from ideal values	
Bonds (Å)	0.010
Angles (°)	1.400
Mean B-factor (Å) ²	94.2

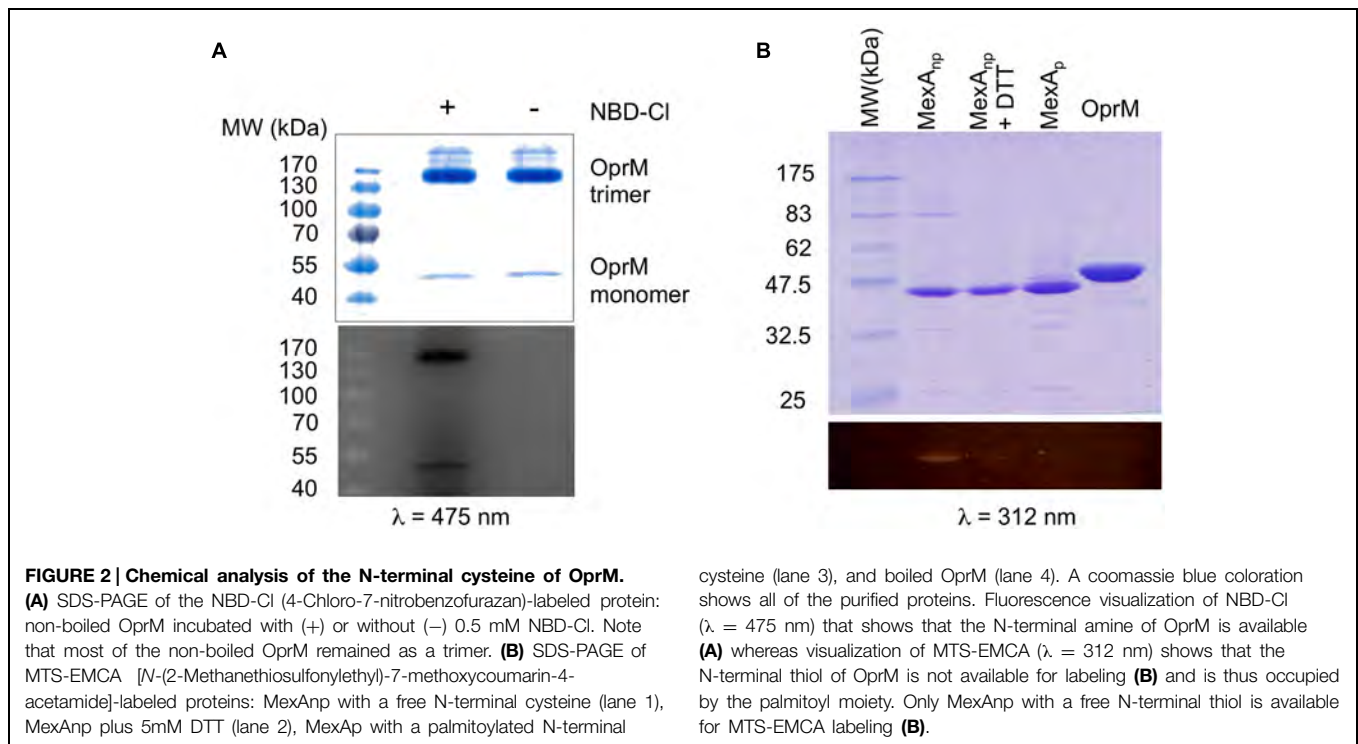
^aValues in brackets correspond to the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$ where $I(h)$ is the observed intensity.

^c $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$.

^d R_{free} was calculated for 7% of reflections randomly excluded from the refinement.

¹<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>



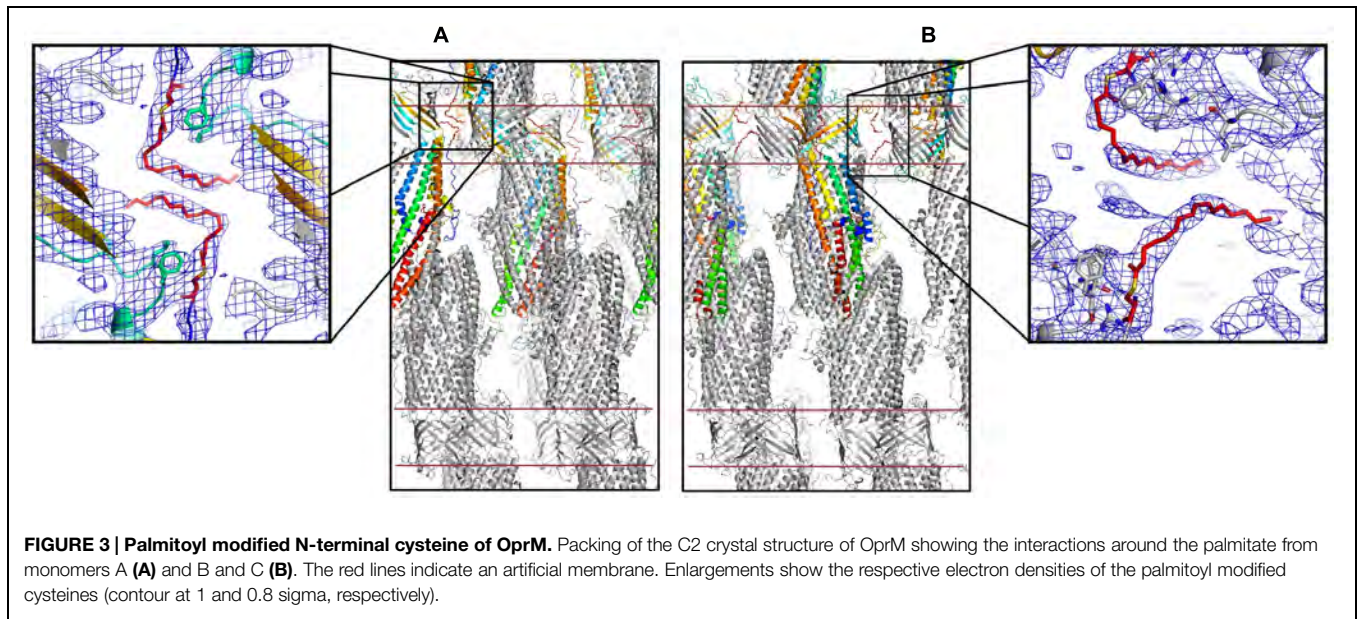
As a third approach, measuring the precise protein mass has also been considered. Indeed, in our case, one needs to distinguish between a palmitoyl (chemical composition $C_{16}H_{32}O_2$ resulting in a mass of 256 Da) and a tri- or di-acyl that can adopt a variable length. As an example, in the CusC structure can be found a tri-acyl composed of $C_{19}O_5H_{33}$ (PDB code: 3PIK) resulting in a mass of 341 Da, or a di-acyl (PDB code: 4K7R) of chemical composition $C_{14}O_4H_{25}$, resulting in a mass of 257 Da, which is close to the mass of a palmitoyl. This result illustrates how difficult it is to obtain an answer using this technique as several combinations result in the same mass and it is necessary to measure mass with a precision as high as one Dalton, which is far to be routinely achieved to date with membrane proteins of that size. Attempts to address this question in the proteolyzed protein using the electrospray and MALDI techniques have been unsuccessful because the N-terminus peptide was not detected despite the use of different protease enzymes, and even though 90% of the OprM sequence was covered by the analysis (data not shown).

OprM Crystal Structure in the C2 Space Group and Comparison with the Structure Solved in P2₁2₁2₁

As the question about the nature of the modification remained unanswered, it has been envisaged to refine the OprM crystallographic structure in a different space group, as different crystal packing could stabilize the N-terminus and eventually reveal the complete structure of the added lipid. We previously solved the structure of OprM at 2.4 Å resolution in the P2₁2₁2₁ space group (Phan et al., 2010) but this structure showed only the beginning of the N-terminal

lipoyl. We previously generated several OprM datasets in the C2 space group, but they were set aside without solving their structures owing to their lower resolution. To investigate the lipoyl structure, we decided to solve the structure of the best diffracting dataset limited to 3.8 Å resolution.

The here-solved structure comprises two trimers in the asymmetric unit with the second trimer being poorly defined. The crystal packing of our C2 OprM structure is slightly different from the P2₁2₁2₁ structure (see Supplementary Figure S2) but they share common type I crystal packing in which the homotrimer channels interact in a head-to-head manner through the hydrophobic beta-barrel domains mimicking a lipid bilayer plane. Despite its higher resolution (2.4 Å), the crystal structure of OprM in the P2₁2₁2₁ space group does not reveal the entire palmitoyl moiety because all the three N-termini are oriented toward the solvent and this results in high thermal motions. For two monomers, the closest amino acid is located more than 10 Å away from the expected palmitate main chain, and for the third, only the cysteine portion is clearly constrained, but this is not sufficient to build in the palmitoyl tail. In contrast, when stabilized by a more packed environment around the N-terminus, the entire fatty acid chain appears in the density map of the C2 form where two different orientations are observed (Figure 3). This is the sole, but crucial, advantage of this structure, because the crystal packing of OprM is equivalent to that previously published in the R32 space group (Akama et al., 2004) with the exception that the three monomers are not linked by crystallographic symmetries. Attempts were made to highlight some eventual local differences between the monomers even if at low resolution. Superposition of the six different



monomers from the C2 asymmetric unit onto monomer A demonstrates a mean C α -atom RMSD of 0.2 Å for monomers B and C, and 0.58 Å for monomers D, E, and F. These monomer superposition values have to be compared to those obtained for the two other structures of OprM in different space groups (a mean RMSD of 0.50 Å for 440 C α atoms in both cases) and that of the other OMF solved structures (1.87 Å for CmeC for 377 C α atoms, 1.28 Å for CusC on 381 C α atoms, 1.79 Å for VceC on 347 C α atoms, 1.32 Å for MtrE on 383 C α atoms, and 2.47 Å on 321 C α atoms for the closest TolC structure [PDB code: 2VDE (Bavro et al., 2008)]. Although no striking differences among the alternative crystal structures of OprM monomers were revealed, this analysis highlights the highly conserved folding within the OMF family with the most divergent being TolC in accordance with the sequence alignment (Supplementary Figure S1). Thus it appears that the only reason OprM would crystallize in either the R32 or C2 space groups is that the N-terminus lipoyl adopts a different conformation within the three monomers. To understand the different orientations of the palmitoyl, we compared their respective environments (**Figure 4**). For the three N-termini, the main chain is stabilized by hydrogen bonds with R133 and the carboxyl group of L128. In each case, the palmitoyl tail then turns around two hydrophobic residues, L128 and F129. The palmitoyl from the B monomer (subsequently called Palm-B) is located near the Palm-C of a symmetrical molecule but not close enough to form van der Waals contact because the distance between them is greater than 7 Å. Interestingly, Palm-A instead makes short van der Waals contacts with its own symmetric structure, justifying the quality of the electron density map for this region (see **Figure 3**) even at low resolution. The quality of the electron density for this particular monomer makes us confident about the exact nature of the fatty acid modification of OprM. As a final control the N-terminal PTMs that were generated in other OMF protein structures, namely CusC and

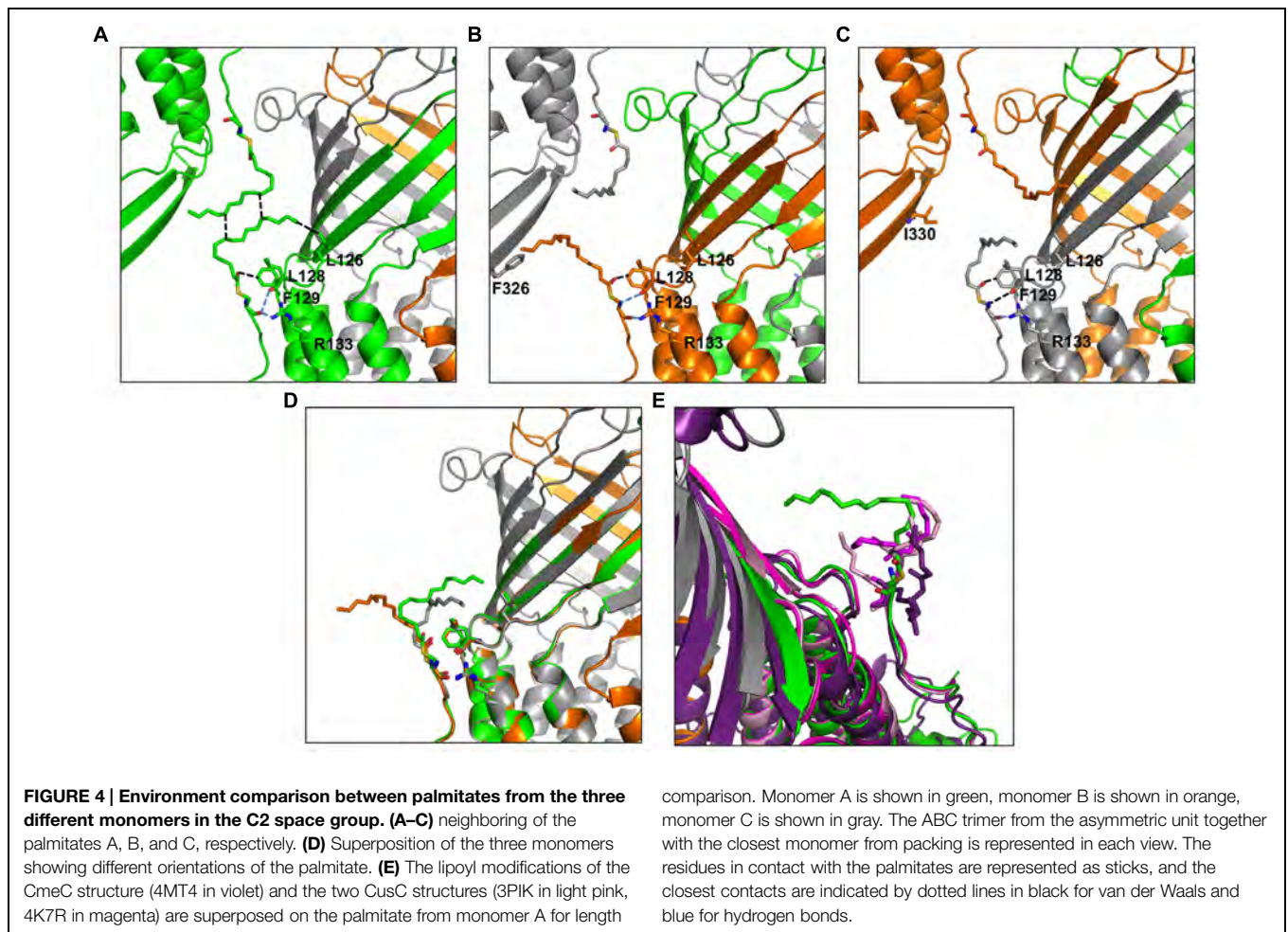
CmeC (**Figure 4E**) were superimposed on our structure and these demonstrate a longer acyl chain for OprM, supporting its palmitoyl nature.

Discussion

Post-translational modifications (PTMs) play an important role in cell life as they govern most signaling events. Among the different PTMs, lipidation ranks as the second most common modification after phosphorylation² (dbPTM – database of protein PTMs; Beltrao et al., 2013), anchoring proteins to the membrane and stabilizing their interactions with the lipid bilayer.

It is not well understood why proteins that are embedded within cellular membranes via a large hydrophobic structural domain need supplementary PTMs such as the N-terminal lipidation of OMF proteins. Akama et al. (2004) suggested that these proteins first have to be anchored to the membrane by an N-terminal lipid so that the insertion of their large hydrophobic domain may be triggered. This later step is critical for the correct folding of OMFs. This hypothesis has been reinforced by structural determination of two CusC mutants for which the signal peptide has been conserved but the first cysteine residue after processing is replaced with a serine (C1S-CusC) or is deleted (Δ C1-CusC), (Lei et al., 2014a). The structures result in a random folding of the beta-barrel domain of both mutants together with inappropriate opening of the periplasmic helices. These structures support the essential role of OMF N-terminal lipidation in the membrane insertion mechanism; moreover, they also highlight the possible involvement of membrane-interacting components in the OMF opening process and consequently the efflux-pump function.

²<http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw>



In addition to this function, other functions have been attributed to lipid PTMs. It has been shown that the size of the hydrophobic regions of membrane proteins does not necessarily match the thickness of the cellular membrane (Mitra et al., 2004). Additional hydrophobic elements could then help membrane proteins to fit into membranes of variable thickness, which would explain why some proteins require the addition of 16 carbons, whereas others require only fourteen, depending on the transmembrane domain shape and size.

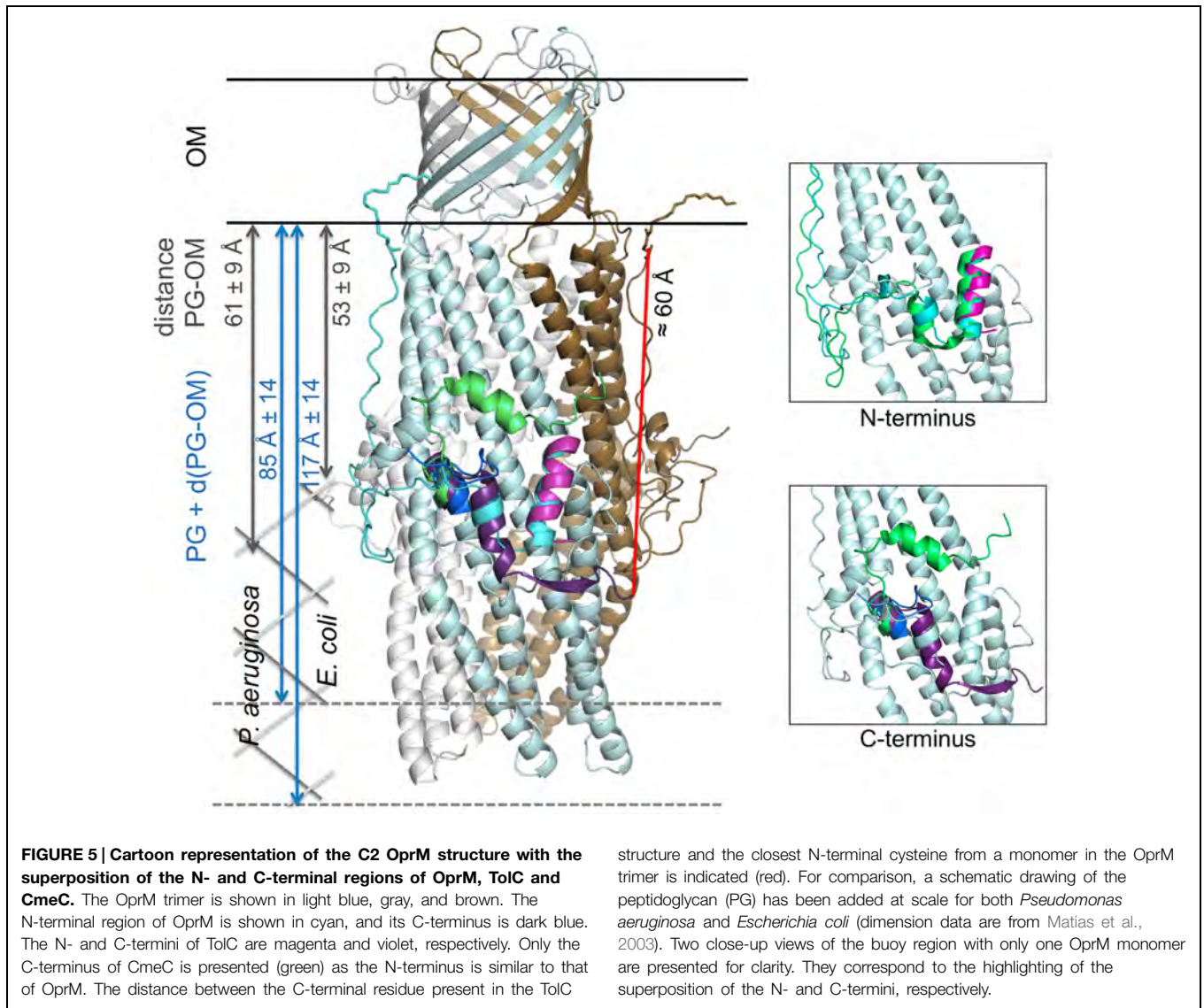
Regarding OprM, several constructs were previously designed for N-terminal labeling, membrane targeting and antibiotic response experiments (Nakajima et al., 2000) and demonstrated that only when residue 18 is a cysteine is the protein labeled by radioactive palmitate and targeted to the outer membrane. Nevertheless, the three tested OprM mutants (C18G, C18F, C18W) were functional, although none were properly targeted to the outer membrane.

Concerning MexA, the MFP component from the OprM-MexAB efflux pump that is also palmitoylated at its N-terminus and attached to the inner membrane, when this PTM is missing MexA becomes unable to interact with OprM as highlighted by *in vitro* blue native gel experiments (Ferrandez et al., 2012).

All of these data highlight interest in the study of these lipoproteins and the protein partners involved in their modification. To gain insight into these lipoproteins, it seemed important to identify which modification occurs on OprM. To that end, we analyzed the chemical accessibility of the N-terminal cysteine thiol and amine using different fluorescent probes, which revealed that only the thiol was occupied. In addition, the nature of the attached lipoyl was proven to be a palmitoyl by our determination of the structure of OprM in a new space group that trapped the lipoyl chain at the interface of one monomer with its own symmetric structure.

We now know the nature of OprM N-terminal PTM, and that other OMFs such as CusC and CmeC from different bacterial strains, have similar but different N-terminal modifications. Nevertheless, if anchorage was important for the function of this class of proteins, why would the analog TolC not undergo PTMs? The sequences of OprM and TolC were submitted to the prediction of palmitoylation site³, which confirmed that C18 was a palmitoylation target in OprM and that there was no such site in the TolC sequence. When comparing the structure of TolC with that of OprM, CusC, and CmeC (Figure 5), it appears

³<http://csspalm.biocuckoo.org/>



that only TolC is different at the N-terminus. In particular, TolC is 44 residues shorter in sequence than OprM (Figure 1; Supplementary Figure S1), meaning that the TolC structure starts at the buoy level. Nevertheless, it should be noted that although it possesses a shortened N-terminus, TolC has a longer C-terminal tail (Figure 1; Supplementary Figure S1), which is not present in its solved structure. Even without knowing anything about the role of this long C-terminal region, it can be hypothesized that it could lead to an additional interaction with the membrane. This hypothesis is supported by the fact that the C-terminal structure of CmeC (an OMF protein with the longest C-terminal sequence of those known) is oriented toward the outer membrane, and the C-terminal alpha-helix of TolC is structurally equivalent to the N-terminal alpha-helix of the other OMFs according to structure superposition (Figure 5). In addition, the distance between the last visible C-terminal amino acid of the TolC structure and the membrane proximal N-terminus of the superposed OprM monomer is approximately 60 Å, a distance that could be covered

by a 42 residue-long helix, which corresponds to the number of residues missing at the C-terminus of the TolC construct.

The fact that TolC can be properly inserted in the membrane despite its particularity, the absence of lipid anchor, can be due to the differences in the peptidoglycan (PG) structure between Gram-negative bacteria. The NMR structure of a 2 kDa synthetic fragment composed of NAG-NAM (pentapeptides; Meroueh et al., 2006) allowed to visualize TolC as completely embedded in the PG, its periplasmic alpha-helical domain just flushing the limit of the PG. Measurements of the cell wall dimensions of both *E. coli* and *P. aeruginosa* were performed by cryo-transmission electron microscopy (Matias et al., 2003), revealing large size differences between the different cell wall constituents, particularly the PG. The empty space between the PG and the outer-membrane d(PG-OM), and the total thickness, PG + d(PG-OM), were estimated to be 53 ± 9 and 61 ± 9 Å for d(PG-OM), and 117 ± 14 and 85 ± 14 Å for PG + d(PG-OM) in *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively

(see **Figure 5**). Consequently, TolC is more likely to be tightly embedded in the membrane barrier than OprM. Nevertheless, no published experiments can support these hypotheses to date.

Conclusion

In this study, we have shown that OprM is palmitylated at its N-terminal cysteine by thio-palmitoylation. It is now necessary to search for the different proteins involved in this acylation, lipid-transferases, and signal peptidases. These lipoprotein modifiers could represent new interesting targets for the fight against antibiotic resistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GP, HB, and IB. Performed the experiments: LM, GP, HB, M-BL, YN, and IB. Analyzed the data: LM, GP, HB, M-BL, YN, MP, and IB. Wrote the paper: GP, MP, and IB.

References

- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., et al. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1948–1954. doi: 10.1107/S0907444902016657
- Aicart-Ramos, C., Valero, R. A., and Rodriguez-Crespo, I. (2011). Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2981–2994. doi: 10.1016/j.bbame.2011.07.009
- Aires, J. R., Kohler, T., Nikaido, H., and Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2624–2628.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., et al. (2004). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J. Biol. Chem.* 279, 52816–52819. doi: 10.1074/jbc.C400445200
- Bavro, V. N., Pietras, Z., Furnham, N., Perez-Cano, L., Fernandez-Recio, J., Pei, X. Y., et al. (2008). Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Mol. Cell* 30, 114–121. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.015
- Bayram, Y., Parlak, M., Aypak, C., and Bayram, I. (2013). Three-year review of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van, Turkey. *Int. J. Med. Sci.* 10, 19–23. doi: 10.7150/ijms.4723
- Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J., and van Noort, V. (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol. Syst. Biol.* 9, 714. doi: 10.1002/msb.201304521
- Bereket, W., Hemalatha, K., Getenet, B., Wondwossen, T., Solomon, A., Zeynudin, A., et al. (2012). Update on bacterial nosocomial infections. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16, 1039–1044.
- Bernal-Perez, L. F., Prokai, L., and Ryu, Y. (2012). Selective N-terminal fluorescent labeling of proteins using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: a method to distinguish protein N-terminal acetylation. *Anal. Biochem.* 428, 13–15. doi: 10.1016/j.ab.2012.05.026
- Cattoir, V. (2004). [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol. Biol.* 52, 607–616. doi: 10.1016/j.patbio.2004.09.001
- CCP4 suite. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763. doi: 10.1107/S0907444994003112
- Chalker, J. M., Bernardes, G. J., Lin, Y. A., and Davis, B. G. (2009). Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem. Asian J.* 4, 630–640. doi: 10.1002/asia.200800427

Acknowledgments

This study was supported by Agence Nationale de la Recherche (Grants ANR-11-BS07-019-04 and ANR-12-BSV8-0010-01). LM was supported by a grant from Vaincre la Mucoviscidose and VE was supported by both Vaincre la Mucoviscidose and the Association Grégory Lemarchal. We acknowledge P. Benas for his assistance in using refinement and building programs. We acknowledge the SOLEIL and the ESRF synchrotrons for providing the synchrotron radiation facilities and thank the technical staff for assistance using beam lines PX1 and ID29. We thank the proteomic platform from Paris Descartes University (3P5: <http://3p5.medecine.univ-paris5.fr/>) for the mass analysis of OprM.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00667>

- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T., and Schweizer, H. P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* 184, 5036–5044. doi: 10.1128/JB.184.18.5036-5044.2002
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., et al. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 35, W375–W383. doi: 10.1093/nar/gkm216
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. Available at: <http://pymol.sourceforge.net/>
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132. doi: 10.1107/S0907444904019158
- Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKeegan, K. S., et al. (2005). The crystal structure of the outer membrane protein VccC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 280, 15307–15314. doi: 10.1074/jbc.M500401200
- Ferrandez, Y., Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Benas, P., Ulryck, N., et al. (2012). Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis. *Electrophoresis* 33, 1282–1287. doi: 10.1002/elps.201100541
- Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325, 1089–1093. doi: 10.1126/science.1176667
- Ghosh, P. B., and Whitehouse, M. W. (1968). 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochem. J.* 108, 155–156.
- Hede, K. (2014). Antibiotic resistance: an infectious arms race. *Nature* 509, S2–S3. doi: 10.1038/509S2a
- Kabsch, W. (1993). Automatic porcessing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800. doi: 10.1107/S0021889893005588
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919. doi: 10.1038/35016007
- Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., and Michell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79, 548–561. doi: 10.1128/IAI.00682-10
- Kulathila, R., Indic, M., and van den Berg, B. (2011). Crystal structure of *Escherichia coli* CusC, the outer membrane component of a heavy metal efflux pump. *PLoS ONE* 6:e15610. doi: 10.1371/journal.pone.0015610
- Lei, H. T., Bolla, J. R., Bishop, N. R., Su, C. C., and Yu, E. W. (2014a). Crystal structures of CusC review conformational changes accompanying

- folding and transmembrane channel formation. *J. Mol. Biol.* 426, 403–411. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.042
- Lei, H. T., Chou, T. H., Su, C. C., Bolla, J. R., Kumar, N., Radhakrishnan, A., et al. (2014b). Crystal structure of the open state of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrE outer membrane channel. *PLoS ONE* 9:e97475. doi: 10.1371/journal.pone.0097475
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000
- Li, X. Z., and Poole, K. (2001). Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 12–27. doi: 10.1128/JB.183.1.12-27.2001
- Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 74–84. doi: 10.1038/nrm2084
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., et al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517, 455–459. doi: 10.1038/nature14098
- Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610. doi: 10.1128/CMR.00040-09
- Matias, V. R., Al-Amoudi, A., Dubochet, J., and Beveridge, T. J. (2003). Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 6112–6118. doi: 10.1128/JB.185.20.6112-6118.2003
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674. doi: 10.1107/S0021889807021206
- Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., et al. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4404–4409. doi: 10.1073/pnas.0510182103
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49, 999–1002. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x
- Miroux, B., and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298. doi: 10.1006/jmbi.1996.0399
- Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., and Engelman, D. M. (2004). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4083–4088. doi: 10.1073/pnas.0307332101
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 3:408. doi: 10.3389/fmicb.2012.00408
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2000). Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 275, 30064–30068. doi: 10.1074/jbc.M005742200
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2002). High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol. Immunol.* 46, 391–395. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02711.x
- Nakayama, H., Kurokawa, K., and Lee, B. L. (2012). Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *FEBS J.* 279, 4247–4268. doi: 10.1111/febs.12041
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- Nikaido, H., and Pages, J. M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 340–363. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x
- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, B. M., and Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 4:103. doi: 10.3389/fmicb.2013.00103
- Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M. B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., et al. (2010). Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM channel. *Structure* 18, 507–517. doi: 10.1016/j.str.2010.01.018
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 12–26. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1–16. doi: 10.1016/S0167-4889(99)00075-0
- Robert, X., and Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, W320–W324. doi: 10.1093/nar/gku316
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* 2, 48–62.
- Su, C. C., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., Bolla, J. R., Lei, H. T., et al. (2014). Crystal structure of the *Campylobacter jejuni* CmeC outer membrane channel. *Protein Sci.* 23, 954–961. doi: 10.1002/pro.2478
- Tooley, J. G., and Schaner Tooley, C. E. (2014). New roles for old modifications: emerging roles of N-terminal post-translational modifications in development and disease. *Protein Sci.* 23, 1641–1649. doi: 10.1002/pro.2547
- Urzhumtseva, L., Afonine, P. V., Adams, P. D., and Urzhumtsev, A. (2009). Crystallographic model quality at a glance. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, 297–300. doi: 10.1107/S0907444908044296
- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 65–70. doi: 10.1038/nrmicro727
- Yen, M. R., Peabody, C. R., Partovi, S. M., Zhai, Y., Tseng, Y. H., and Saier, M. H. (2002). Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1562, 6–31. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00359-0

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Monlezun, Phan, Benabdelhak, Lascombe, Enguéné, Picard and Broutin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

OprM $\alpha 6$ $\alpha 7$ $\beta 3$ TT TT

270 280 290 300 310 320

OprM D L L I Q R R P D I L E A E H Q L M A A N A S I G A A R A A F F P S I S L T A N A G T M S R Q L S G L F D A G S

CusC Q I L L Q R P D I M E A E H A L M A A N A N I G A A R A A F F P S I S L T S G I S T A S S D L S S L F N A S S

MtrE E V L L D R P D I R A A E H A L K Q A N A N I G A A R A A F F P S I R L T G T V G T G S A E L G G L F K S G T

CmeC T I L L Q R P D I G S S L E K L T Q Q N Y L V G V A R T A F L P S L S L T G L L G F E S G D L D T L V K G S

VCEC G L L G H R A D I T A A R W R A E A A Q Q V G I A Q A Q F Y P D V T L S A F I G Y Q A F G L D H L F D S G N

TolC E A E K R N L S L L Q A R L S Q D L A R E Q I R Q A Q D G H L P T L D L T A S T G I S D T S Y S G S K T R G A A G T Q Y

OprM $\beta 4$ $\alpha 8$

330 340 350 360 370

OprM G S W L F Q P S I N L P I F T A G S L R A S L D Y A K I Q K D I N V A Q Y E K A I Q T A F Q E V A D G L A A R

CusC G M W N F I P K I E I P I F N A G R N Q A N L D I A E I R Q Q Q S V V N Y E Q K I Q N A F K E V A D A L L A L R

MtrE G V W S F A P S I T L P I F T W G T N K A N L D V A K I R Q Q A Q I V A Y E S A V Q S A F Q D V A N A L A A R

CmeC K T W N I G G N F T L P I F H W G E I Y Q N V N L A K L N K D E A F V N Y Q N T L I T A F G E I R Y A L V A R

VCEC D A G A I G P A I Y L P L F T G G R L E G Q L T S A E A R Y Q E A V A Q Y N G T L V Q A L H E I A D V V T S S

TolC D D S N M G Q N K V G L S F S L P I Y Q G M V N S Q V K Q A Q Y N F V G A S E Q L E S A H R S V V Q T V R S S F N N I

OprM $\alpha 9$

380 390 400 410 420 430

OprM G T F T E Q L Q A Q R D L V K A S D E Y Y Q L A D K R Y R T G V D N Y L T I L D A Q R S L F T A Q Q Q L I T D R L N Q L

CusC Q S L N D Q I S A Q Q R Y L A S L Q I T L Q R A R A L Y Q H G A V S Y L E V L D A E R S L F A T R Q T L L D L N Y A R Q

MtrE E Q L D K A Y D A L S K Q S R A S K E A L R L V G L R Y K H G V S G A L D I L D A E R S S Y A A E G A A L S A Q L T R A

CmeC K T I R L Q Y D N A Q A S E Q S Y K R I Y E I A K E R Y D I G E M S L Q D Y L E A R Q N W L N A A V A F N N I K Y S Y A

VCEC Q A L Q A R I N K T E Q A V Q Q A E Q A L H I A T N R Y Q G G L A T Y L D V L V A E E S L L N N Q R A L V N L Q S R A F

TolC N A S I S S I N A Y K Q A V V S A Q S S L D A M E A G Y S V G T R T I V D V L D A T T T L Y N A K Q E L A N A R Y N Y L

OprM

440 450 460

OprM T S E V N L Y K A L G G G W N Q Q T V T Q Q Q T A K K E D P Q A

CusC V N E I S L Y T A L G G G

MtrE E N L A D L Y K A L G G G L K R D T Q T D K

CmeC N S I V D V I K A F G G G F E Q S E D T S K N I K E E S K N L D M S F R E

VCEC S L D I A L I H A L G G G F E T T E S

TolC I N Q L N I K S A L G T L N E Q D L L A L N N A L S K P V S T N P E N V A P Q T P E Q N A I A D G Y A P D S P A P V V Q

OprM

OprM

CusC

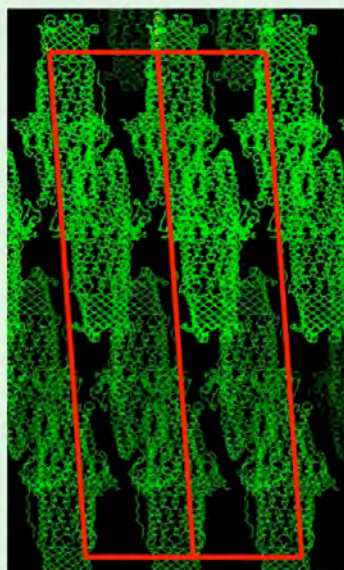
MtrE

CmeC

VCEC

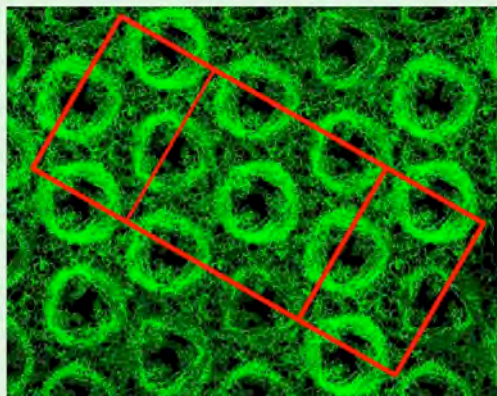
TolC Q T S A R I T T S N G H N P F R N

Figure S2. Comparison of the two OprM packings: C2 (A) and P2₁2₁2₁ (B). The unit cell is colored in red and the cell parameters are indicated.

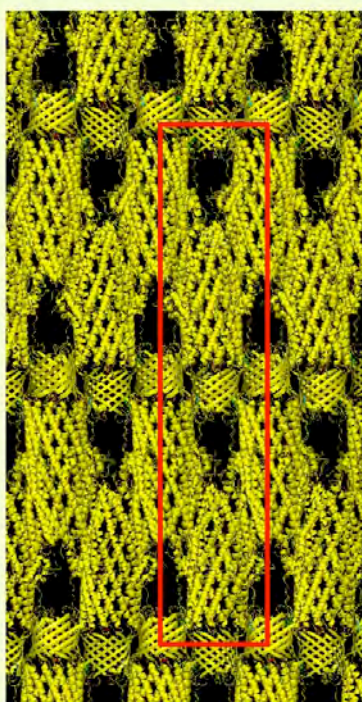


**OprM packing in space group C2
with two trimmers per unit cell**

$a = 152.6$, $b = 87.9$, $c = 355.9$ Å, $\beta = 98.9^\circ$

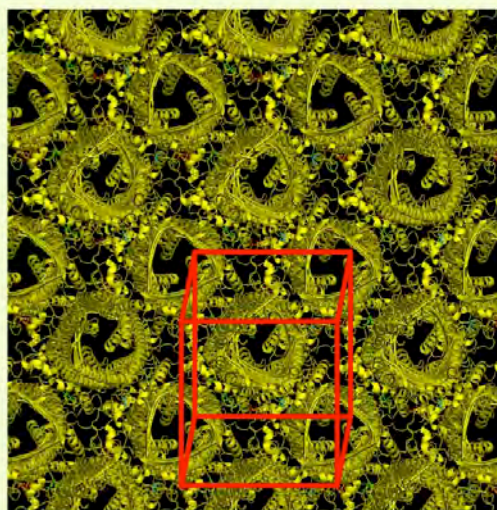


(A)



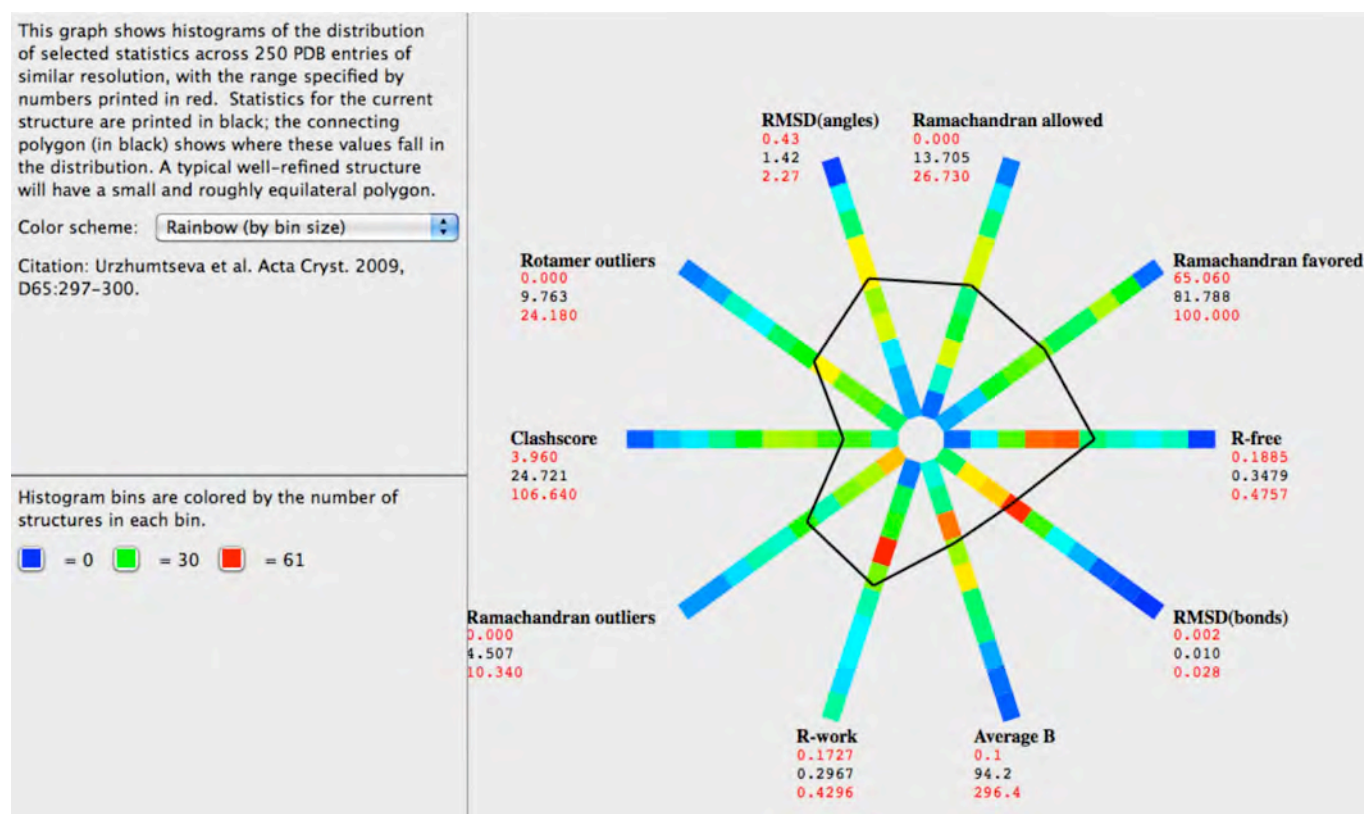
**OprM packing in space group P2₁2₁2₁
with one trimmer per unit cell**

$a = 73.9$ Å $b = 70.2$ Å $c = 344.5$ Å



(B)

Figure S3. Quality assessment of the OprM structure refinement in the C2 space group by the polygon evaluation from Phenix



2. Mécanisme d'ouverture des OMF : caractérisation structurale d'un mutant du canal OprM ouvert dans un état intermédiaire

Comme décrit précédemment, le canal OMF des pompes d'efflux tripartites est fermé au niveau de son extrémité périplasmique par un jeu de liaisons hydrogènes et de ponts salins. L'efflux de molécules à travers ce canal nécessite donc son ouverture.

Plusieurs structures du canal OprM ont été résolues dans différents groupes d'espace : en R32 à 2,56 Å de résolution (code PDB 1WP1), en P2₁2₁2₁ à 2,4 Å de résolution (code PDB 3D5K) et en C2 à 3,8 Å de résolution (code PDB 4Y1K) (Akama & al, 2004 ; Phan & al, 2010 ; Monlezun & al, 2015). Malgré le fait qu'elles appartiennent à des groupes d'espace différents, toutes ces structures ont cependant été résolues en conformation fermée. Cette conformation semble donc être la plus stable en l'absence des partenaires, d'autant plus qu'elle permet de préserver la bactérie de l'entrée d'antibiotiques ou d'agents thérapeutiques. L'analyse par modes normaux réalisée à partir de la structure de plus haute résolution (2,4 Å) a permis d'identifier les résidus majoritairement impliqués dans la stabilisation de la forme fermée, formant des ponts salins R403-D409 et D416-R419 ou des liaisons hydrogènes D205-Y404 (**Fig. 91**). Parmi ces résidus, certains ont été mutés soit seuls, soit simultanément, afin de casser ces interactions. Le phénotype de résistance de ces mutants a été déterminé par des mesures de CMI par complémentation *in vivo*. Ces résultats seront présentés dans le **paragraphe 3**.

Afin de pouvoir corrélérer nos observations fonctionnelles à des modifications structurales, deux de ces mutants d'ouverture ont été clonés dans *E. coli* pour en déterminer la structure, le mutant D416-R419A et le mutant R403L-Y404F-D416A-R419A, que nous appellerons par la suite respectivement 2mut et 4mut par souci de simplicité. Nous présentons ici la structure du mutant 4mut résolue par cristallographie aux rayons X, les cristaux obtenus pour le 2mut n'ayant pas permis de collecter un jeu de données à haute résolution.

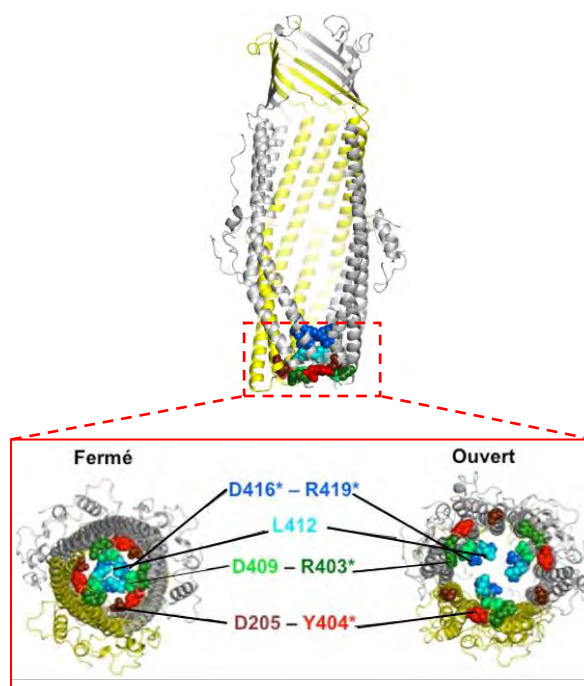


Figure 91 : Identification des résidus contrôlant l'ouverture de la porine. Les résidus mutés sont marqués d'un astérisque.

2.1. Expression, purification et cristallisation des mutants du canal OprM

2.1.1. Expression et purification

Les mutants du canal OprM sont surexprimés de façon recombinante chez *E. coli* à partir de la souche C43 Δ acrB. Les premiers tests d'expression se sont avérés infructueux à cause de la présence d'une insertion dans la séquence du mutant 4mut, qui provoquait un décalage du cadre de lecture et d'un très faible rendement de production du mutant 2mut (20 μ g/litre de culture). Les conditions de purification ont par la suite été optimisées, notamment en produisant les deux protéines (2mut et 4mut) dans du TB (Terrific Broth) à partir de gros volumes (allant jusqu'à 15 L) car elles sont faiblement exprimées. Le TB est un milieu enrichi tamponné qui permet de limiter l'acidification du milieu au cours de l'expression des protéines. Il permet également une induction tardive, augmentant la

biomasse. L'expression est induite à 18°C sur la nuit afin d'améliorer le rendement de production.

Les protéines, fusionnées à une étiquette poly-histidine (6-His) ajoutée au niveau de l'extrémité C-terminale, sont extraites des membranes externes d'*E. coli*, en présence de DDM. Elles sont ensuite purifiées jusqu'à homogénéité par chromatographie en présence de β OG avec un échange de détergent au cours de la chromatographie d'affinité sur colonne nickel, car OprM ne cristallise pas en présence de DDM. Les protéines éluées sont alors traitées par protéolyse ménagée à la trypsine, comme préambule à la cristallisation. Elles sont ensuite repurifiées par chromatographie d'exclusion stérique sous la forme d'un pic majoritaire correspondant à un homotrimère d'environ 150 kDa (**Fig. 92**). Les échantillons non chauffés et analysés sur gel (**Fig. 93**) montrent cependant que le trimère du mutant 4mut est beaucoup moins stable que le trimère du mutant 2mut, car on observe la présence d'une bande correspondant au monomère chez le mutant 4mut qui est absente chez le mutant 2mut. Ce résultat suggère que le tonneau β n'est pas suffisant pour stabiliser le trimère lorsque la protéine est extraite de la membrane externe et qu'un minimum de liaisons hydrogènes dans l'extrémité périplasmique sont nécessaires pour le conserver. Les rendements de culture sont de 200 μ g/L dans les deux cas.

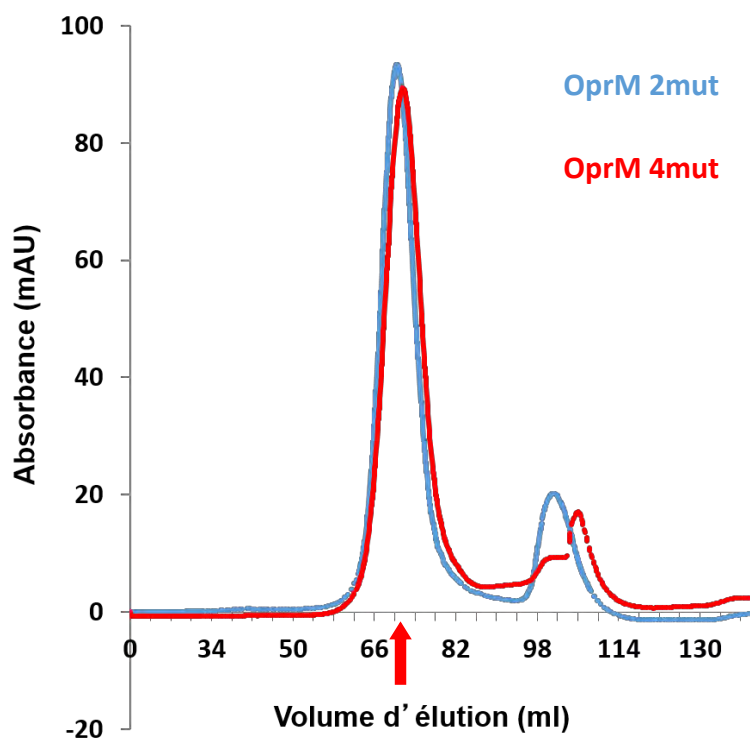


Figure 92 : Profil d'élution des mutants d'OprM en chromatographie d'exclusion stérique. Les protéines sont majoritairement éluées sous forme de trimère, à l'aide d'une colonne pré-calibrée. Les deux protéines (OprM 2mut en bleu et OprM 4mut en rouge) présentent des volumes d'élution légèrement différents (70, 68 mL pour le 2mut et 71, 88 mL pour le 4mut). Le pic en sortie de colonne correspond probablement à la trypsine et à ses produits de digestion suite à la protéolyse ménagée.

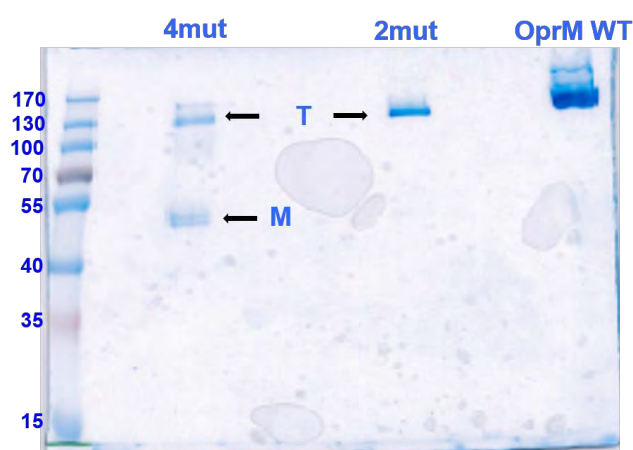


Figure 93 : Analyse des fractions d'OprM éluées après chromatographie d'exclusion stérique. Les échantillons n'ont pas été chauffés, afin de préserver le trimère et la protéine OprM native, migrant sous forme trimérique, sert de contrôle de poids moléculaire. **M** : monomère. **T** : trimère.

2.1.2. Cristallisation

Les différents essais de cristallisation ont été réalisés à partir des protéines protéolysées et concentrées à 5 mg/mL (2mut) et 6 mg/mL (4mut). Plusieurs pistes de cristallisation sont obtenues au bout d'une semaine à 18°C pour le mutant 4mut et au bout d'un peu plus d'un mois pour le mutant 2mut à partir de trois kits commerciaux [*MemGold*TM (MD1-39), *MemGold2*TM (MD1-63) et *MemStart*TM/*MemSys*TM HT-96 (MD1-21 et MD1 -25)].

Environ 30 conditions ont permis d'obtenir des cristaux après screening pour le mutant 4mut et 4 d'entre elles ont été optimisées manuellement. Ces conditions sont résumées par le **Tableau 14**. 2 d'entre elles (**1** et **2**) ont permis d'obtenir de gros cristaux en forme d'hexagone (**Fig. 94**) et ces cristaux ont permis de collecter plusieurs jeux de données complets dont un à 2,84 Å de résolution à partir d'une condition contenant du sulfate de sodium 60 mM, sulfate de lithium 50 mM, Tris 50 mM, pH 8.5, 30% (v/v) PEG 400, 0,9% β OG.

Conditions	Solution de cristallisation	Protéine
1 (<i>MemGold</i> - 1 -7)	50 – 150 mM Sulfate d'ammonium, 100 mM HEPES, pH 7.5, 10 – 16 % PEG 4000 (w/v), 20 – 25 % Glycérol, 0,9 % βOG (w/v)	OprM – 4mut
2 (<i>MemGold</i> – 2 -11)	0 – 200 mM Sulfate de sodium, 0 – 200 mM Sulfate de Lithium, 50 mM Tris, pH 8.5, 30 – 40 % PEG 400 (v/v), 0,9 % βOG (w/v)	
3 (<i>MemGold2</i> – 1 -39)	50 – 200 mM Chlorure de Calcium, 100 mM Glycine, pH 9, 9 – 17 % PEG 4000 (w/v), 0,9 % βOG (w/v)	
4 (<i>MemGold2</i> – 1 -40)	100 – 300 mM Sulfate d'ammonium, 500 mM ADA, pH 6.5, 11 – 17 % PEG 4000 (w/v), 0,9 % βOG (w/v)	
5 (<i>MemSys</i> – 10)	100 mM chlorure de sodium, 100 mM sulfate de lithium, 100 mM MES, pH 6.5, 30% PEG 400 (v/v), 0,9 % βOG (w/v)	OprM – 2mut

Tableau 14 : Récapitulatif des conditions de cristallisation des mutants d'OprM optimisées manuellement.

Les kits utilisés et les positions correspondant aux différentes conditions sont indiqués entre parenthèses. La condition de cristallisation du mutant 2mut correspond à une piste obtenue après screening automatisé au Mosquito. Le β OG provient du tampon de purification qui contient également du Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Glycérol 10 %.

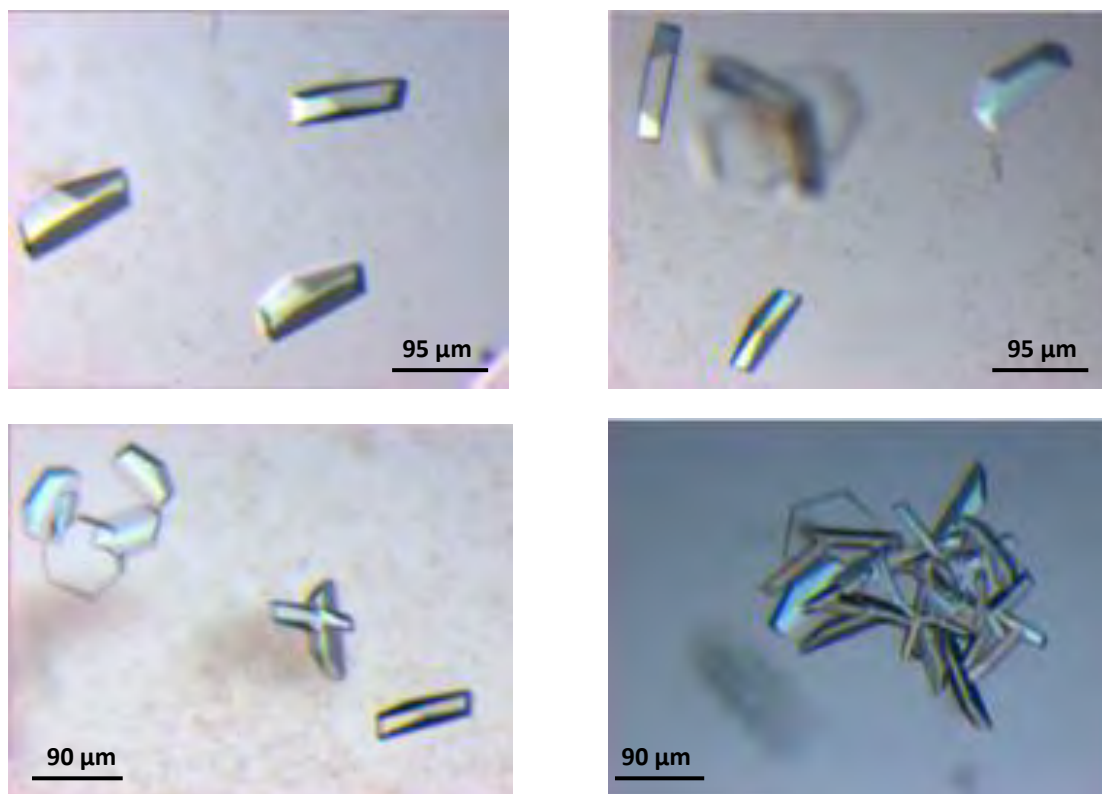


Figure 94 : Cristaux du mutant 4mut d'OprM obtenus au bout d'une semaine à 18°C (à 6 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après optimisation manuelle à partir de la condition 2.

Des cristaux obtenus après screening pour le mutant 2mut, dans deux conditions dont une contenant du chlorure de sodium 100 mM, sulfate de lithium 100 mM, MES 100 mM, pH 6.5, 30% (v/v) PEG 400, 0,9% β OG (w/v) (**Fig. 95**) ont permis de collecter un jeu de données pour ce mutant. Ce jeu était cependant à une résolution trop basse pour être exploitable (16 Å). Ces cristaux nécessiteront une optimisation plus poussée pour améliorer leur pouvoir de diffraction car ce mutant semble moins bien cristalliser que le mutant 4mut.

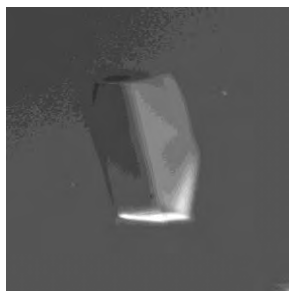


Figure 95 : Cristal du mutant 2mut d'OprM obtenu au bout d'un peu plus d'un mois à 18°C (à 5 mg/mL après protéolyse ménagée à la trypsine) après screening automatisé à l'aide du robot Mosquito.

2.2. Résolution de la structure cristallographique du mutant 4mut du canal OprM

Plusieurs jeux de données ont été enregistrés sur la ligne de lumière PX1 au synchrotron SOLEIL (Saclay), dont un jeu complet à une résolution de 2,84 Å à partir de 1800 images collectées avec un pas d'oscillation de 0,1°, à une longueur d'onde de 0,97857 Å. Le **Figure 96** présente un cliché de diffraction obtenu pour ce jeu de données. L'indexation et l'intégration de ce jeu à l'aide du programme *iMOSFLM* ont permis de déterminer les paramètres de maille d'OprM correspondant au groupe d'espace monoclinique C2, avec une complétude de 99,6%. Le **Tableau 15** résume les statistiques d'intégration.

La structure de plus haute résolution de la forme sauvage d'OprM (code PDB 3D5K), dont les résidus d'intérêt ont été mutés à l'aide du logiciel *MacPymol*, a servi de modèle pour l'étape de remplacement moléculaire réalisée à l'aide du programme *PHASER*. Cela a permis de positionner deux trimères d'OprM-4mut dans l'unité asymétrique, comme pour la structure de la forme native résolue dans le même groupe d'espace C2 (code PDB 4Y1K).

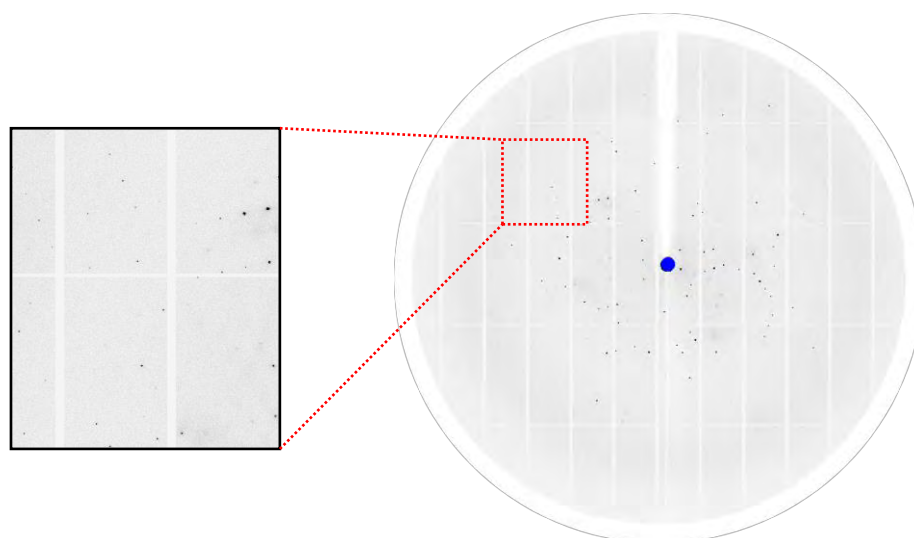


Figure 96 : Cliché de diffraction d'un cristal du mutant 4mut d'OprM diffractant à 2,84 Å de résolution. Les tâches sont peu intenses mais bien séparées.

Cependant, il a été nécessaire de positionner d'abord le premier trimère, puis de rechercher le second dans un deuxième temps, le programme ayant du mal à positionner ce dernier de par la très grande symétrie du canal. En effet, il est très facile de se tromper d'un douzième de tour le long de l'axe, amenant la structure à tourner d'une hélice du domaine α à l'autre. La solution finale présente de très bon facteurs de corrélation (RFZ = 4,4, TFZ = 18,9, LLG_{final} = 10039).

Avant d'affiner la structure, le modèle ainsi obtenu a été optimisé par une étape de *jelly body* à l'aide du programme *REFMAC*. Cette procédure, basée sur du positionnement en corps rigide, combiné à de la dynamique, a permis de tenir compte de l'éventuelle ouverture des extrémités des hélices périplasmiques par rapport à la structure native.

Après plusieurs cycles d'affinement, certaines régions de la carte de densité électronique restaient moins bien définies, notamment au niveau de la région d'intérêt comportant les résidus mutés. Un cycle de recuit simulé a donc été réalisé afin d'éliminer les biais liés au modèle de départ. La carte de densité électronique a ainsi pu être améliorée et a permis d'ajouter également 7 molécules de β OG. Néanmoins, à cette résolution, ni les molécules d'eau, ni le palmitate ou encore l'étiquette poly-histidine n'ont pu être

reconstruits. 20 873 atomes ont été affinés et la structure finale inclut 96% des résidus de chaque trimère. Les paramètres d'affinement sont résumés dans le **Tableau 15**.

		Cette étude
Statistiques d'intégration		
Longueur d'onde (Å)		0.978
Distance cristal – détecteur (nm)		578.44
Groupe d'espace		C 1 2 1
Paramètres de maille	a, b, c (Å)	150.37 ; 87.03 ; 352.621
	α , β , γ (°)	90 ; 98.16 ; 90
Coefficient de Matthews (Å ³ /Da)		3.81
Pourcentage de solvant (%)		67.69
Résolution (Å)		349.05 – 2.84 (2.92 – 2.84)
Nombre de réflexions observées		322223
Nombre de réflexions uniques		100 701
R _{merge} (%)		9.9 (69.3)
Complétude (%)		99.6 (94)
Redondance		3.2 (3.2)
I / σ (I)		5.9 (0.9)
Statistiques d'affinement		
Contenu de l'unité asymétrique (kDa)		300
R _{work} / R _{free}		25.19 / 31.07
Nombre d'atomes (protéine)		20 873
Nombre d'ions		2
Nombre de ligands	Détergent	7
Déviation r.m.s	Pour les liaisons (Å)	0.020
	Pour les angles (°)	2.165
Facteur de température (B) moyen (Å ²)		89.208
Diagramme de Ramachandran	Zones favorables (%)	90.32
	Zones permises (%)	6.7
	Zones défavorables (%)	2.98

Tableau 15 : Statistiques d'intégration et d'affinement de la structure du mutant ouvert, 4mut d'OprM. Les données indiquées entre parenthèses correspondent à la couche de plus haute résolution.

L'ensemble de la structure présente un facteur de température plus élevé que l'estimation réalisée par le programme truncate sur la base de l'analyse du Wilson plot (89 Å² contre 54,8 Å²), ce qui est classique pour des structures résolues à basse résolution. L'un des deux trimères présente néanmoins un facteur de température plus élevé que le premier

(116,19 Å² contre 64,45 Å²), indiquant une plus grande agitation, ce qui pourrait expliquer la difficulté observée lors du remplacement moléculaire. La géométrie de la structure finale a été vérifiée et validée à l'aide des modules de validation du programme *COOT* et du programme de validation de structure en ligne *MolProbity*.

2.3. Analyse structurale

La structure cristallographique du 4mut dans lequel quatre résidus avaient été mutés afin de provoquer l'ouverture du canal (R403L-Y404F-D416A-R419A), a été résolue à 2,84 Å de résolution avec deux trimères au sein de l'unité asymétrique. Les résidus de substitution ne présentent ni charge opposée ni encombrement stérique (Leu, Phe, Ala) et les interactions intramonomériques entre les résidus D205 et Y404, D409 et R403 et intermonomérique entre les résidus D416 et R419 sont donc rompues.

2.3.1. Réarrangement structural des hélices du domaine coiled-coil

La superposition de la structure du mutant 4mut à celle du canal en conformation fermée (code PDB 3DK5) montre un réarrangement des hélices périplasmiques avec un léger élargissement du pore. On observe un relâchement de la contrainte de torsion des hélices et un réalignement de celles-ci, avec un mouvement de rotation antihoraire (**Fig. 97**). Ce mécanisme dit « iris-like » (car il mime l'ouverture d'un objectif d'appareil photographique) a été précédemment décrit pour TolC pour lequel des mutants ouverts ont été caractérisés et pour MtrE dont la structure a été résolue en conformation ouverte (Andersen & al, 2002 ; Bavro & al, 2008 ; Pei & al, 2011 ; Lei et al., 2014).

L'ouverture semble être initiée par les hélices externes H3 et H7 de chaque monomère, qui présentent un déplacement plus important et dont la réorientation semble nécessaire pour créer l'espace permettant la réorientation des hélices internes H4 et H8. L'hélice H7 semble être le point de départ de ce réarrangement car les mutations Y404F et

R403L entraîne respectivement la perte de la liaison hydrogène avec le résidu D205 de l'hélice H4 et la rupture du pont salin avec le résidu D409, ce qui provoque la réorientation de l'hélice. Cette réorientation affecte l'hélice H8 qui est entraînée dans le déplacement de l'hélice H7 à laquelle elle est liée et crée l'espace nécessaire à sa nouvelle conformation.

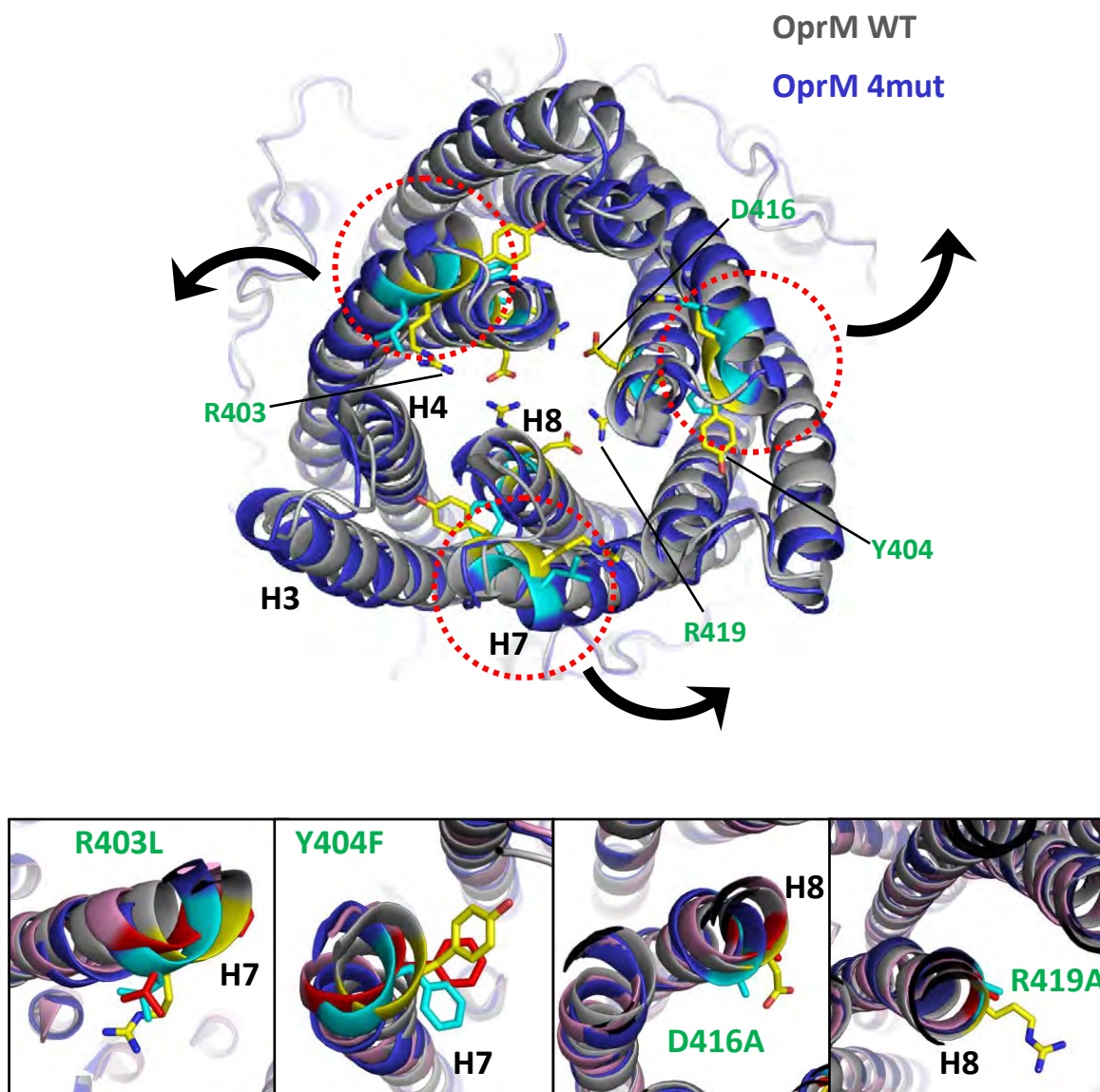


Figure 97 : Superposition des structures du canal en conformation fermée (OprM WT, en gris) et du mutant 4mut (OprM 4mut, en bleu) montrant les réarrangements structuraux autour des résidus mutés. Les résidus mutés sont représentés en jaune chez OprM WT et en cyan chez OprM 4mut. Le panneau inférieur montre les réarrangements structuraux des quatre résidus mutés au sein des structures superposées d'OprM WT (en gris) et des deux trimères de l'unité asymétrique d'OprM 4mut (en bleu et en rose). Les résidus sont représentés en jaune pour OprM WT et en rouge et cyan pour les deux trimères d'OprM 4mut.

Cependant, malgré les mutations des résidus D416 et R419, qui provoquent la rupture des ponts salins intermonomériques entre les hélices H8 de chaque monomère, le mouvement de ces hélices ainsi que celui des hélices H4 reste moins important que celui des hélices externes H7 et H3, l'hélice H8 étant notamment bloquée par le cycle aromatique du résidu F404 du mutant Y404F. Ces résultats semblent indiquer que d'autres résidus sont certainement impliqués dans la stabilisation de la conformation fermée et qu'une réorientation du résidu Y404 est nécessaire pour permettre le réalignement complet de l'hélice H8 et un élargissement du pore, afin de permettre le passage de substrats.

Par ailleurs, tout comme TolC ou OprN, OprM présente une seconde constriction, à l'intérieur du canal. Le passage des substrats nécessite une ouverture complète du canal et implique donc une dilatation de cette constriction. La structure du mutant 4mut montre un élargissement de la seconde constriction par rapport à la constriction périplasmique (**Fig. 98**). Cet élargissement est cependant peu lié à l'ouverture du canal, mais à l'absence des chaînes latérales des résidus D416 et R419 qui forment cette constriction et qui sont remplacés par un résidu à chaîne latérale plus courte (Alanine). Néanmoins, la réorientation de l'hélice H8, liée à d'une part celle de l'hélice H7 à laquelle elle est liée et à la rupture du pont salin formé par ces résidus d'autre part, contribue à éloigner d'avantage les résidus hydrophobes de substitution au sein du trimère et par conséquent, à élargir le pore au niveau de la seconde constriction.

Ces changements conformationnels semblent cependant indiquer une ouverture séquentielle du pore. Cette région a été décrite comme étant la région d'interaction avec le transporteur RND. La présence des partenaires du canal pourrait s'avérer nécessaire pour une dilatation complète du pore, notamment grâce au mécanisme d'efflux péristaltique asymétrique du transporteur.

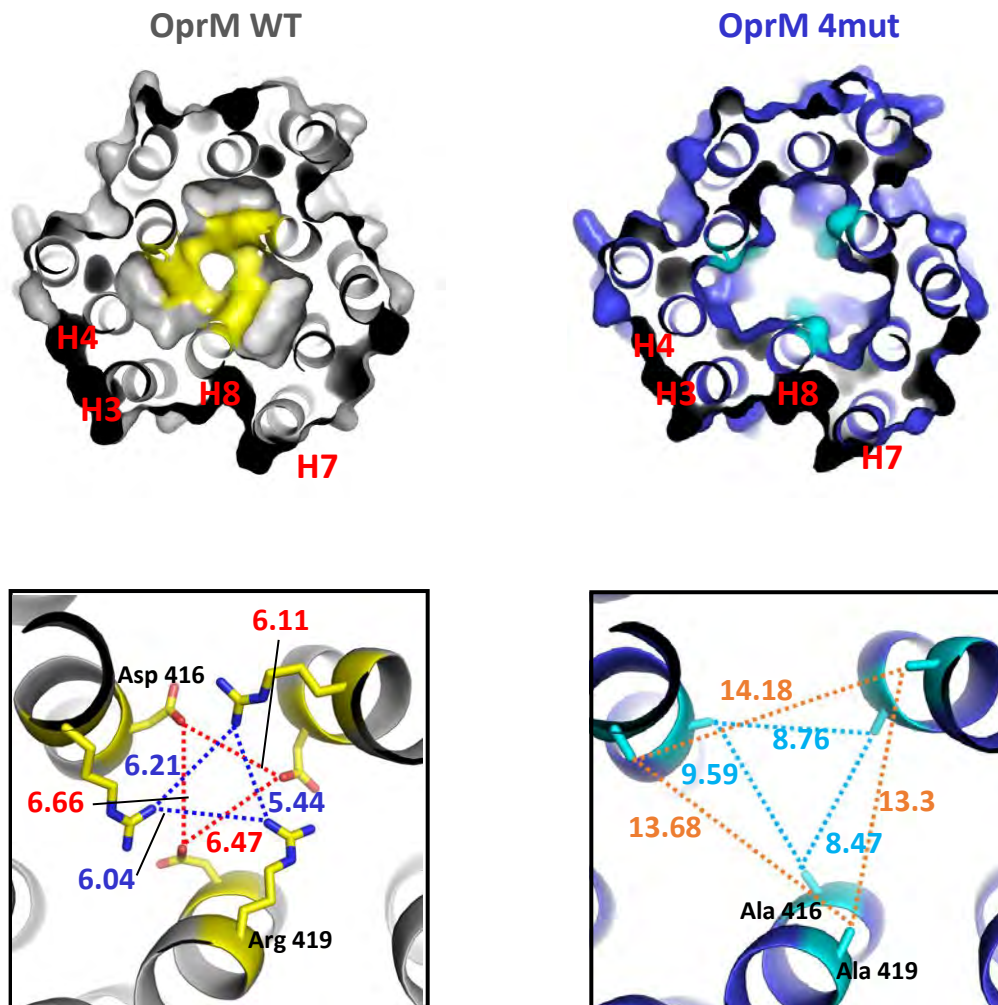


Figure 98 : Dilatation du pore au niveau de l'anneau Asp-Arg. Le panneau supérieur montre l'anneau présent au niveau de la seconde constriction, représenté en jaune pour OprM WT (à gauche) et en cyan pour OprM 4mut (à droite), vue depuis l'extrémité extracellulaire. Les dimensions entre les résidus sont indiquées par le panneau inférieur.

2.3.2. La triade Leucine, une clé de voûte conservée

Les monomères d'OprM 4mut sont symétriques, mais on observe une asymétrie au niveau du point de constriction le plus important du pore périplasmique. Le résidu Leu412 situé au niveau de cette constriction présente en effet une asymétrie, l'extrémité de la chaîne latérale n'étant pas orientée de la même manière dans les trois monomères, entraînant ainsi des variations de distances entre les atomes allant de 3,7 Å à 5 Å (**Fig. 99**).

Ce résidu hydrophobe, conservé chez les OMFs de *P. aeruginosa*, obstrue l'extrémité périplasmique du canal dans sa conformation fermée.

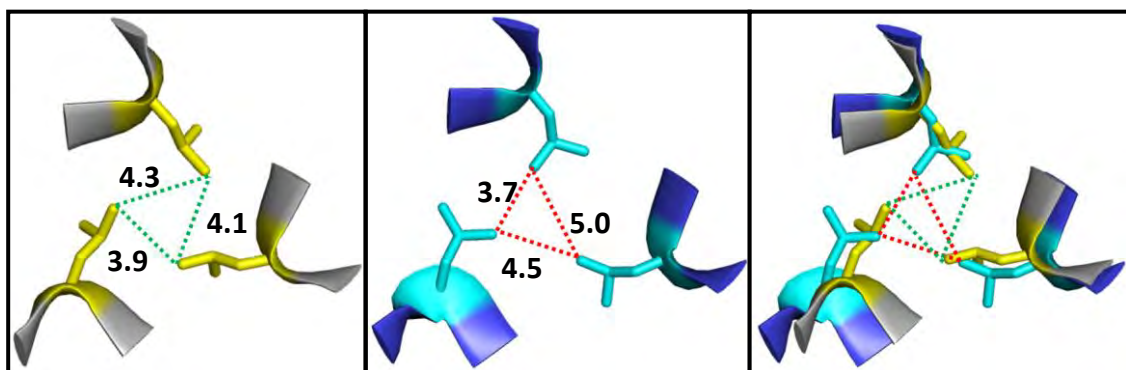
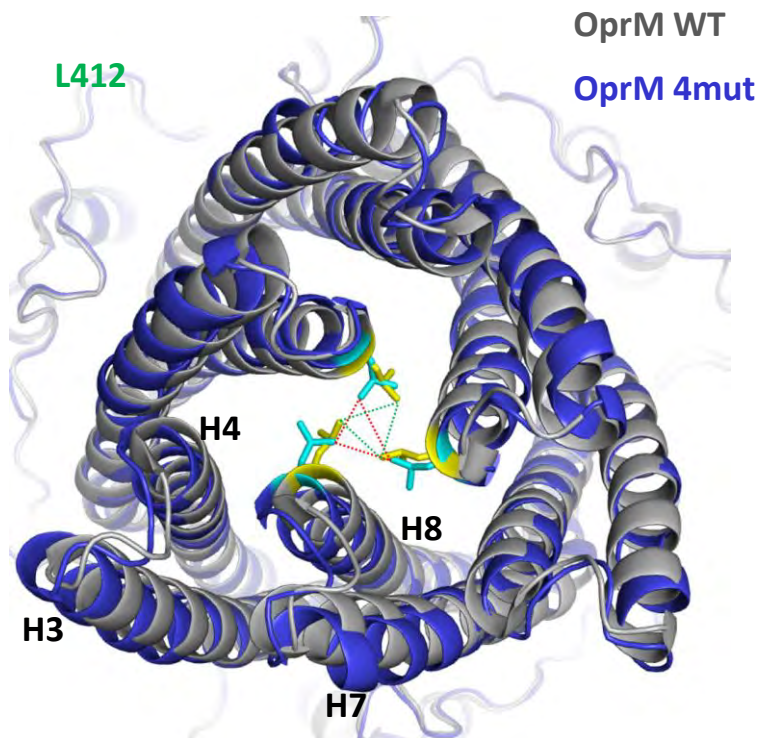


Figure 99 : Mouvement hélicoïdal de la leucine 412 conservée de la constriction périplasmique. OprM WT est représenté en gris et OprM 4mut en bleu. Le panneau inférieur indique les distances entre les leucines de chacun des monomères (en jaune pour OprM WT et en cyan pour OprM 4mut) et les résidus d'OprM WT et d'OprM 4mut sont superposés.

La caractérisation structurale du double mutant de TolC (TolC^{YF-RS}, les résidus Y362F et R367S correspondant aux résidus Y404 et D409 d'OprM) a montré que la mutation des résidus du réseau de liaisons hydrogène et de ponts salins de l'extrémité périplasmique entraîne une ouverture conséquente du pore (50 Å²). Malgré une réorientation des hélices liées aux mutations, la leucine 412 maintient les distances observées dans la structure en conformation fermée. Le réarrangement de l'hélice H7 ne se propage donc pas à ce résidu et l'élargissement du pore reste donc limité, tout comme dans la structure du mutant simple de TolC (TolC^{RS}).

Nous avons donc émis l'hypothèse que ce résidu (Leu412) pourrait également être impliqué dans l'ouverture du canal. Nous avons donc choisi de le muter, seul ou simultanément avec les quatre précédentes mutations afin de déterminer son implication dans l'ouverture du canal. Les différents clonages sont en cours afin de caractériser ce mutant aussi bien *in vitro* (gel natif, structure) qu'*in vivo* au niveau fonctionnel. Bien que nous n'ayons pas réussi à ouvrir le canal, nous avons néanmoins montré un éloignement des hélices externes et une légère rotation de la chaîne latérale du résidu leucine chez le mutant 4mut par rapport à la structure d'OprM WT dans le sens antihoraire, ce qui va dans le sens du mécanisme d'ouverture « iris-like ». La structure du mutant 4mut révèle donc le démarrage du mécanisme d'ouverture.

3. Implication de l'ouverture du canal dans l'assemblage et le fonctionnement de la pompe : caractérisation fonctionnelle de mutants ouverts du canal OprM par complémentation *in vivo*

Comme indiqué précédemment, l'analyse par modes normaux réalisée par Gilles Phan pendant sa thèse sur la structure d'OprM résolue à 2,4 Å de résolution avait permis d'identifier les résidus majoritairement impliqués dans la stabilisation de la forme fermée, formant des ponts salins (R403-D409 et D416-R419) ou des liaisons hydrogène (D205-Y404). En parallèle de la caractérisation structurale du 4mut décrite dans le chapitre précédent, nous avons procédé à leur caractérisation fonctionnelle.

Sept mutants ont été générés : quatre mutants simples (R403L, Y404F, D416A, R419A), deux doubles mutants (R403L-Y404F, D416A-R419A) et le quadruple mutant 4mut. Ces mutants ont été analysés par complémentation *in vivo* à l'aide d'une souche de *P. aeruginosa* délétée du gène codant pour le canal OprM, la souche PAO1ΔOprM. Les mutants avaient préalablement été clonés à l'aide du vecteur pME6001 par L. Monlezun au cours de sa thèse. Ce vecteur présentait cependant l'inconvénient de surexprimer les protéines d'intérêt de façon basale. Sur les conseils de nos collaborateurs de Besançon, nous avons donc re-cloné les gènes dans un autre vecteur, le pUCP24. Les deux vecteurs portent le même gène de résistance à la gentamicine mais diffèrent par la taille et la nature du promoteur, le pUCP24 ayant un promoteur faible, plus en accord avec le niveau d'expression naturel de la bactérie. Les tests d'expression montrent cependant qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux d'expression de ces deux vecteurs (**Fig. 100**). Cela pourrait être dû au fait que le pUCP24 est un vecteur multicopies, de plus petite taille (4036 bp) que le pME6001 (7425 bp), donc plus facilement dupliqué par la bactérie, ce qui permet d'atteindre des taux d'expression comparables à ceux du pME6001. En conséquence, nous avons décidé de continuer nos expériences en parallèle avec les gènes clonés dans les deux vecteurs pour voir s'il y avait des différences de résultat.

Afin de déterminer l'effet des antibiotiques sur l'expression des protéines, nous avons analysé des extraits de cellules entières obtenus après culture en absence d'antibiotiques (**Fig. 100**). Les taux d'expression en présence ou en absence d'antibiotiques

sont comparables, la présence de l'antibiotique n'affecte donc pas l'expression des protéines.

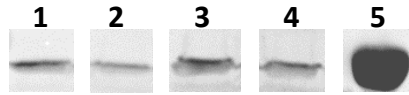


Figure 100 : Expression d'OprM à partir des vecteurs pME6001 et pUCP24. Les protéines ont été exprimées à l'aide des vecteurs pME6001 (pistes 1 et 3) et pUCP24 (pistes 2 et 4), en présence (pistes 1 et 2) ou en absence d'antibiotiques (pistes 3 et 4). Les échantillons correspondant aux extraits de cellules entières ont été analysés par western blot à l'aide d'un anticorps anti-histidine. La protéine OprM sauvage purifiée sert de contrôle de poids moléculaire (piste 5).

3.1. Réalisation des antibiogrammes et évaluation de la résistance aux antibiotiques

Les mutants ont été analysés en présence de différentes familles d'antibiotiques par plusieurs méthodes :

- ✚ la méthode de diffusion en milieu gélosé à l'aide de disques imprégnés,
- ✚ la méthode de dilution en milieu gélosé et
- ✚ la méthode de diffusion en milieu gélosé par gradient (E-test).

Ces méthodes sont utilisées de façon classique dans le domaine clinique pour évaluer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. La première est qualitative, car la mesure des diamètres d'inhibition peut être approximative, surtout en présence de halos d'inhibition jointifs, mais elle permet un diagnostic rapide pour estimer les souches infectant un patient. Les deux autres techniques sont quantitatives, et permettent de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques testés sur la souche pathogène.

N'ayant jamais utilisé la technique E-test au laboratoire, nous avons voulu comparer ces différentes méthodes pour caractériser le phénotype de nos mutants. Les bandelettes E-test sont plus chères à l'achat mais sont sensées être plus pratiques d'utilisation car elles

sont constituées d'une bande de plastique (ou de carton) imprégnée d'un gradient d'antibiotique d'un côté et d'une échelle de graduation de l'autre, ce qui permet de déterminer une CMI sur une seule boîte de Pétri. La valeur de la CMI est lue sur la bandelette au niveau de l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette. Néanmoins cette technique s'est révélée présenter plus d'inconvénients que d'avantages pour la réalisation de nos expériences.

Le conditionnement peut constituer une limite à l'utilisation de ce test. Les bandelettes en carton sont trop rigides. Ce matériau rend difficile l'adhésion à la gélose et les bandelettes ont tendance à s'incurver et à se décoller de la gélose, ce qui entraîne une mauvaise diffusion de l'antibiotique (**Fig. 101A.**). De plus, suivant le type de bactérie, les conditions de culture, les conditions de séchage de la gélose après ensemencement, la taille de l'inoculum ou encore la nature de l'antibiotique, on observe la présence de microcolonies à l'intérieur de l'ellipse d'inhibition (**B et C**), notamment en présence de carbapénèmes tels que le méropénème ou l'imipénème. On observe également la présence d'ellipses d'inhibition diffuses (**D**) ou encore de doubles ellipses d'inhibition (**E**) ainsi que des ellipses d'inhibition qui forment une intersection avec la bandelette au niveau de deux graduations différentes. Toutes ces contraintes rendent les résultats difficilement interprétables et parfois non reproductibles. Dans nos mains, l'E-test reste certes une méthode rapide pour l'évaluation de la CMI, mais nous l'avons abandonnée, la méthode par dilution s'étant révélée la plus adéquate.

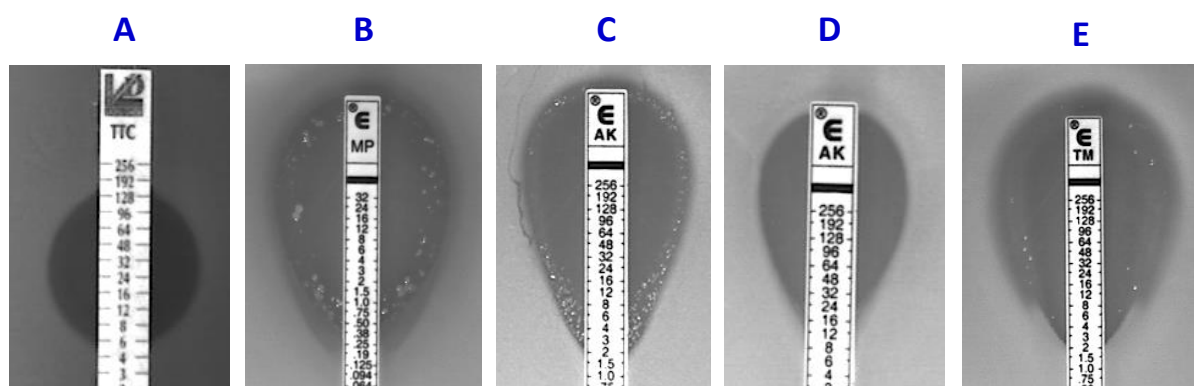


Figure 101 : Résultats des mesures de CMI par la méthode de diffusion par gradient (E-test) pour la combinaison Ticarcilline-clavulanate (A), du méropénème (B), de l'amikacine (C, D) et de la tobramycine (E).

16 antibiotiques appartenant aux différentes familles ont été utilisés pour la réalisation des antibiogrammes (**Fig. 102**), et 8 d'entre eux ont été utilisés pour la détermination des CMI en milieu gélosé.

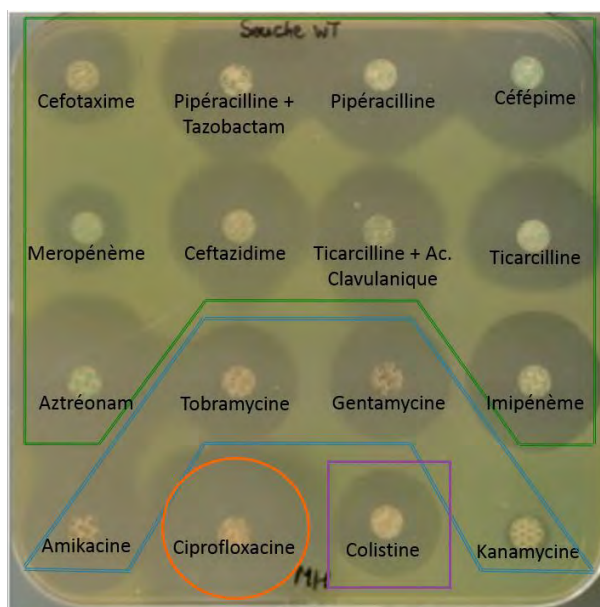
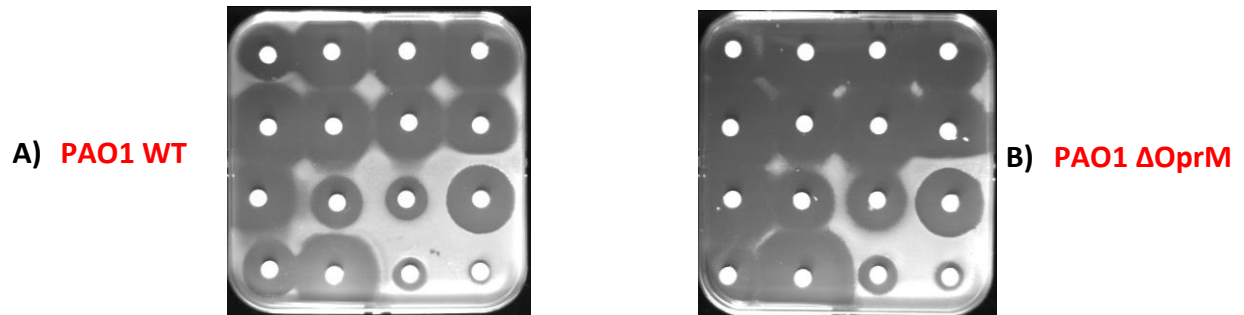


Figure 102 : Antibiotiques testés lors de la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de disques imprégnés. La disposition des antibiotiques est indiquée et les familles d'antibiotiques sont encadrées en vert pour les β -lactamines, en bleu pour les aminoglycosides, en orange pour une fluoroquinolone et en violet pour une polymyxine.

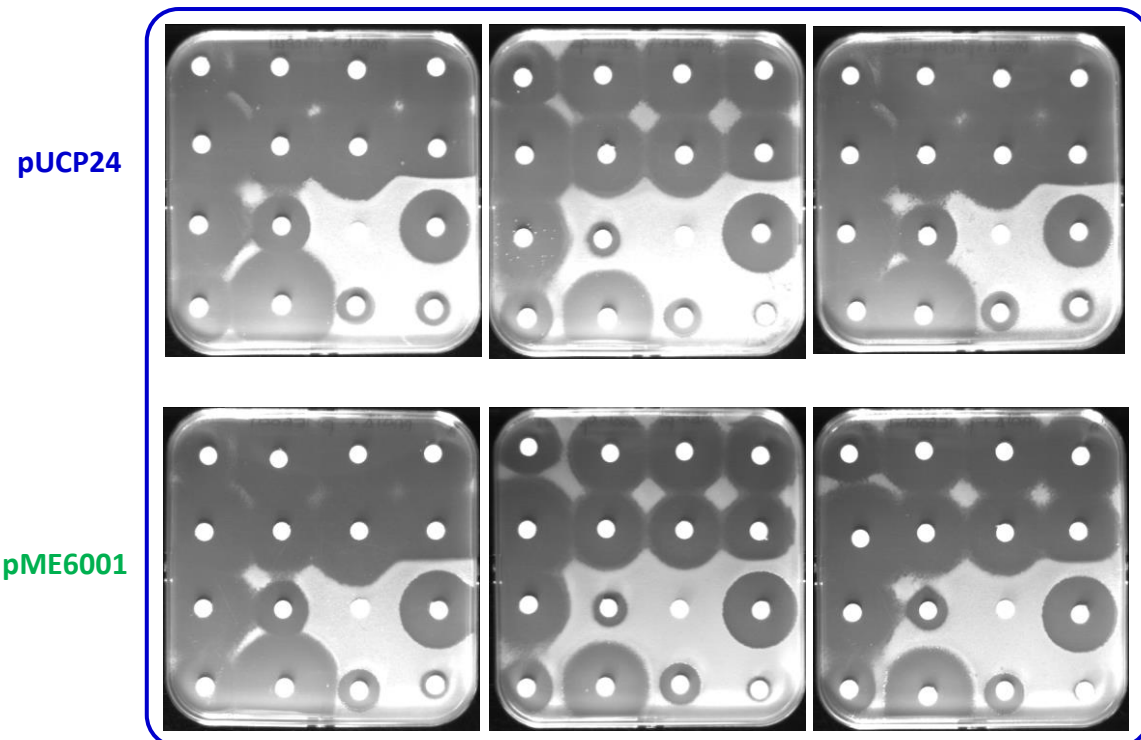
L'analyse des antibiogrammes réalisés par la méthode de diffusion à l'aide de disques imprégnés montre des profils de résistance similaires avec les deux vecteurs pour quatre des sept souches mutantes analysées. Par contre, le mutant R403L et le 4mut sont moins résistants tandis que le mutant Y404F est plus résistant avec le vecteur pUCP24, par rapport au vecteur pME6001. Cependant, en ce qui concerne les mutants simples, la diminution de résistance étant observée pour la totalité des disques d'antibiotiques, il est fort probable que cela soit dû à une différence de nombre de copies du vecteur dans la souche transformée et non pas à l'effet de la mutation.

En plus de l'analyse des souches mutantes, différents contrôles sont réalisés. Sont analysées la souche sauvage PAO1 WT (**Fig. 103A**) et la souche délétée PAO1 Δ OprM (**Fig. 103B**) afin de connaître les niveaux de résistance avec et sans le gène OprM, ainsi que la souche PAO1 Δ OprM complémentée avec le vecteur vide (**Fig. 103C**) pour vérifier que le vecteur n'apporte pas un biais à l'analyse, et enfin la souche PAO1 Δ OprM complémentée avec le vecteur portant le gène d'OprM WT (**Fig. 103D**) pour vérifier qu'il restaure un profil de résistance identique à celui de la souche sauvage.

Les différentes souches restent peu sensibles à la kanamycine, *Pseudomonas* étant naturellement résistante à cet aminoglycoside. De même, les résultats sont identiques pour les quatre souches pour l'imipénème, cet antibiotique n'étant pas substrat de la pompe MexAB-OprM. La complémentation de la souche PAO1 Δ OprM avec le vecteur vide (**Fig. 103C**) restaure la résistance à la gentamicine de par la présence du gène de résistance porté par le vecteur. Cette résistance apparaîtra donc sur tous les antibiogrammes des mutants.



C) **PAO1 ΔOprM + vecteur** D) **PAO1 ΔOprM + OprM wt** E) **PAO1 ΔOprM + OprM R403L**



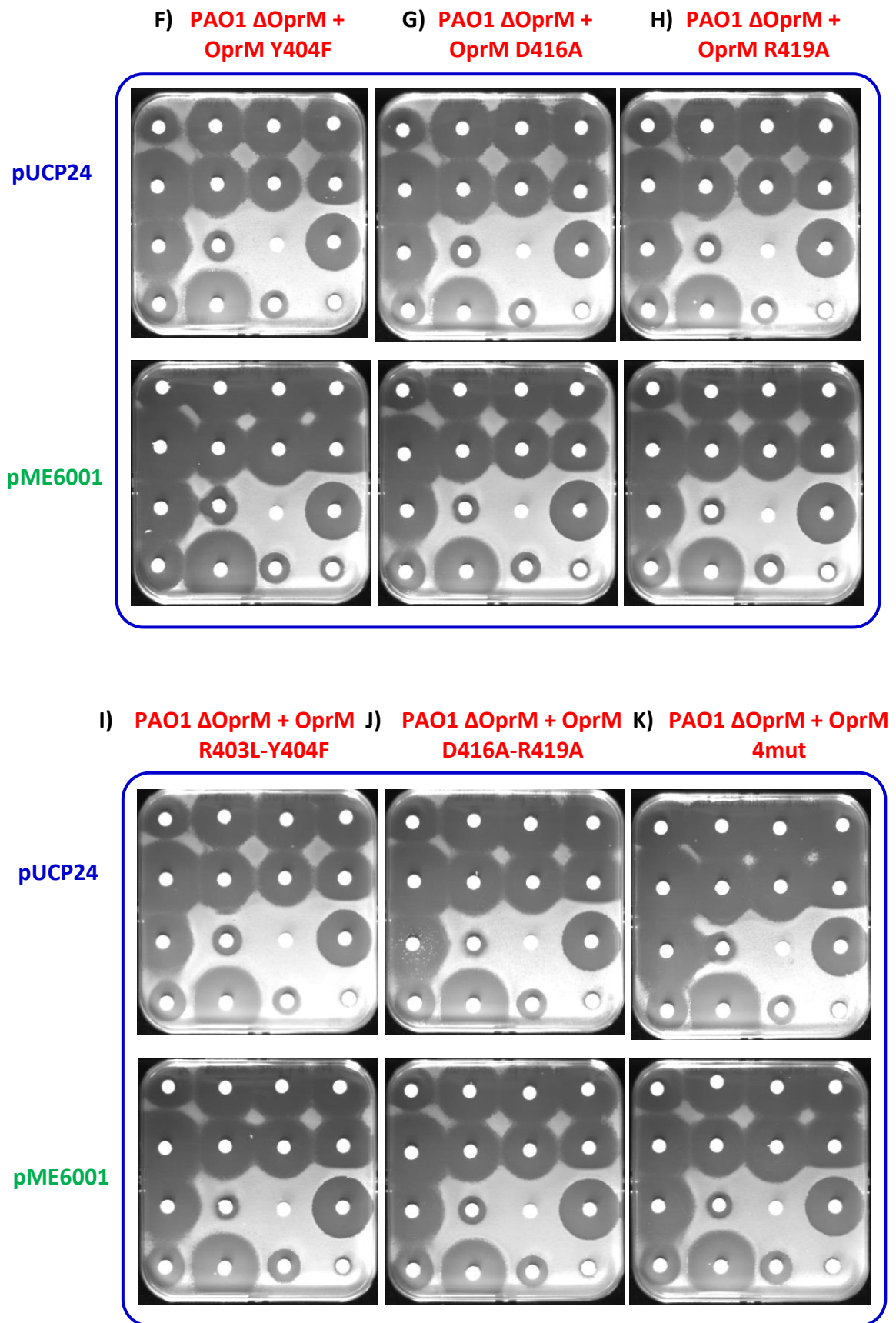


Figure 103 : Antibiogrammes des mutants d'OprM clonés à partir des vecteurs pME6001 et pUCP24.

Comme décrit précédemment par Monlezun & al lors de sa thèse, contrairement à ce que nous attendions, les mutants semblent présenter peu de différences de résistance par rapport à la souche sauvage PAO1 WT. Les mutants Y404F, D416A, R419A et R403L-Y404F (**Fig. 103F à I**) présentent un profil de résistance similaire à celui de la souche sauvage PAO1 wt, notamment pour les β -lactamines. Le mutant D416A-R419A (**Fig. 103J**) semble légèrement plus sensible à ces antibiotiques et les mutants R403L (**Fig. 103E**) et 4mut (**Fig. 103K**) sont beaucoup plus sensibles, comme nous l'avons déjà vu. Toutes les mutations restaurent la résistance aux aminoglycosides et notamment à la tobramycine en dehors du mutant R403L, même s'il est difficile de réaliser des comparaisons précises sur des antibiogrammes. De même, des différences sont détectables pour la ciprofloxacine et la colistine, mais il est difficile de classer les différentes souches, juste sur la base de ces halos de résistance.

3.2. Détermination des CMI

Les mesures de CMI permettent de comparer les phénotypes de résistance de façon plus précise. Elles ont été réalisées en milieu gélosé par la méthode de dilution en présence de 8 antibiotiques afin de quantifier la résistance des mutants analysés. Nous avons choisi une fluoroquinolone, deux aminoglycosides, et cinq β -lactamines couvrant les différentes générations d'antibiotiques de cette famille, dont deux carbapénèmes, l'imipénème qui n'est pas substrat de la pompe MexAB-OprM et le méropénème qui est substrat de la pompe. Sur la **Figure 104A** sont présentés les résultats obtenus par L. Monlezun avec le vecteur pME6001 et ceux que nous avons obtenus dans le vecteur pUCP24 (**Fig. 104B**). Malgré des différences ponctuelles dans les résultats obtenus avec ces deux vecteurs, seuls ceux que nous avons mesurés en pUCP24 seront commentés.

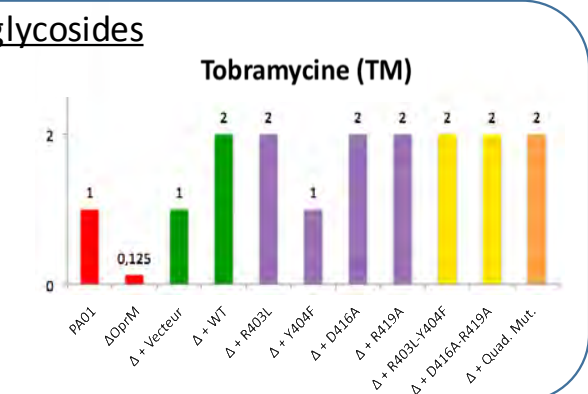
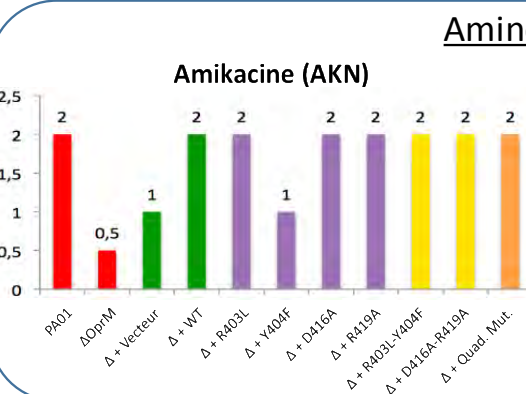
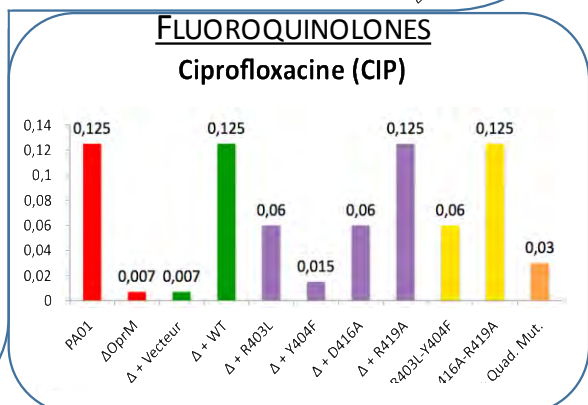
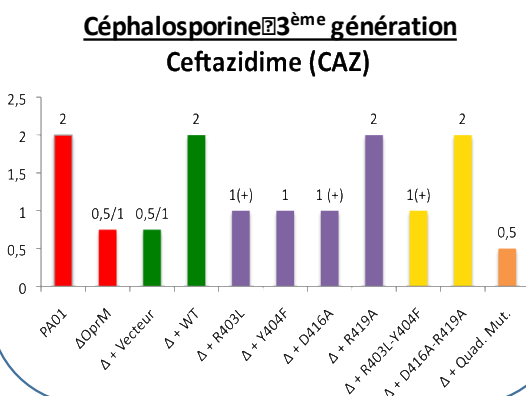
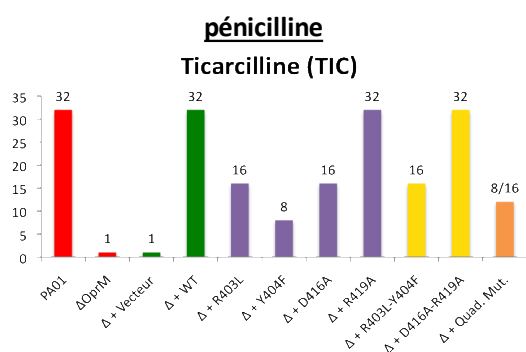
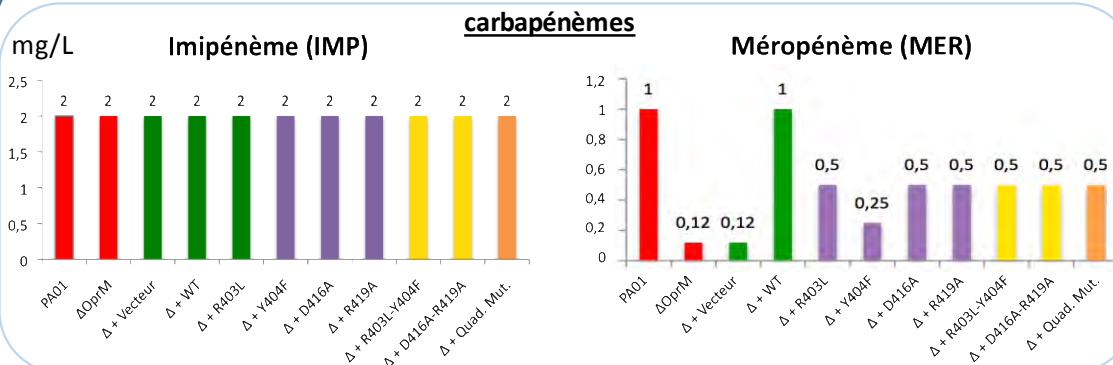
Les mesures de CMI ne montrent aucune différence entre les souches pour l'imipénème, que le canal OprM soit présent ou non, montrant l'homogénéité de nos inocula. Concernant les souches contrôle en présence du méropénème, la souche PAO1 Δ OprM, transformée ou non avec le vecteur vide, présente une augmentation de sensibilité d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage PAO1 WT, mais ce profil de

résistance est restauré après complémentation de la souche avec la forme sauvage d'OprM, indiquant ainsi que la pompe est fonctionnelle.

L'analyse des valeurs de CMI pour les autres β -lactamines montre que la souche PAO1 Δ OprM est 2 fois plus sensible que la souche PAO1 WT en présence de la ceftazidime et cette sensibilité va jusqu'à un facteur 32 pour la ticarcilline. Le vecteur seul ne confère pas de résistance, par contre, la complémentation avec OprM WT restaure bien une résistance similaire à celle de la souche PAO1, à l'exception de l'aztréonam, pour lequel la souche est 2 fois plus sensible et des aminoglycosides pour lesquels la souche est 2 à 4 fois plus résistante sans que l'on en comprenne la raison. Néanmoins, le vecteur de complémentation portant le gène de résistance à la gentamicine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides, il se peut que cela ait une incidence sur les résultats obtenus pour les deux antibiotiques de cette famille. Des résultats étranges avaient d'ores et déjà été obtenus dans le vecteur pME6001 pour ces antibiotiques, la complémentation avec le vecteur seul restaurant la résistance de la souche sauvage pour la tobramycine.

A

β -LACTAMINES



B

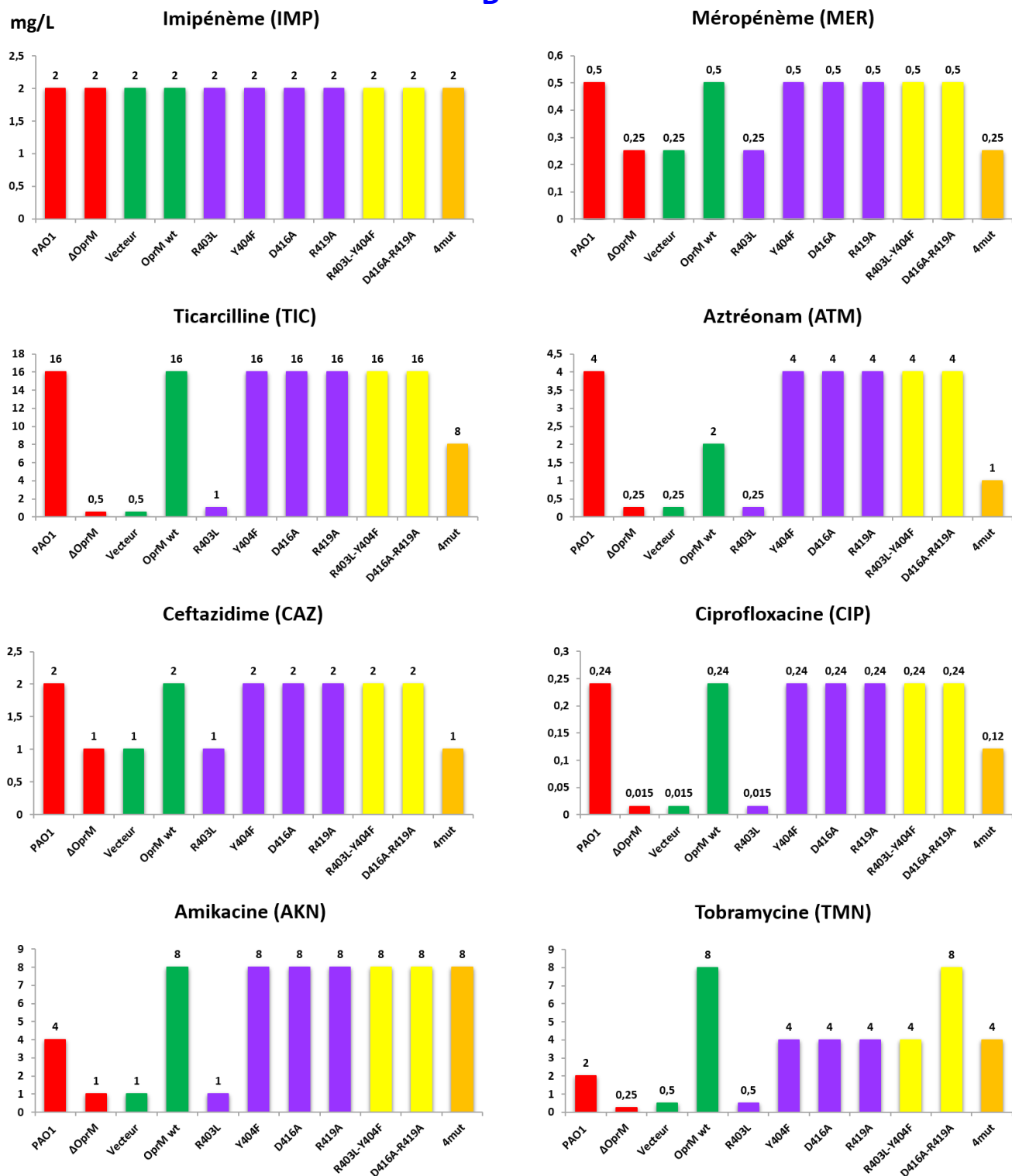


Figure 104 : Mesure des CMI (mg/L) de mutants d'OprM par la méthode de dilution en milieu gélosé à partir des vecteurs pME6001 (A, Monlezun & al) et pUCP24 (B, cette étude). Les CMI ont été déterminées en présence de 8 antibiotiques et les résultats sont présentés par antibiotique pour l'ensemble des souches testées. Les valeurs de CMI correspondant aux souches contrôle PAO1 wt et PAO1ΔOprM sont représentées en rouge, celles de la souche PAO1ΔOprM transformée avec le vecteur vide ou la forme sauvage du canal en vert. Les simples mutants sont représentés en violet, les doubles mutants en jaune et le quadruple mutant en orange.

Concernant les mutants, il apparait clairement que le R403L se comporte comme la souche délétée quel que soit l'antibiotique utilisé, reflétant certainement un problème de transformation de la souche ou d'adressage de la protéine, d'autant plus que ce phénomène n'était pas du tout observé avec le vecteur pME6001. Il en est de même pour le mutant Y404F qui montrait des différences systématiques lorsqu'il était apporté par le vecteur pME6001, et qui ne montre aucune modification de résistance en pUCP24. Pour les autres mutants, on observe peu de différences de résistance par rapport à la souche sauvage à l'exception du 4mut pour les β -lactamines et la fluoroquinolone. Les mutations individuelles ne semblent donc pas affecter l'efflux.

Pour les doubles mutants, seul le mutant D416A-R419A a un comportement légèrement différent des autres dans les tests à la tobramycine, montrant une résistance double par rapport aux autres mutants, mais tout en étant au même niveau qu'OprM WT. Cela n'avait pas été observé dans les tests réalisés avec le pME6001. Nous pouvons donc dire que seul le mutant 4mut présente un profil de résistance qui diffère de celui des autres mutants. Il est en effet 2 à 4 fois plus sensible que la souche sauvage PAO1 WT. Il a été montré pour TolC, grâce à des expériences d'interaction (SPR), que l'ouverture du canal entraîne une diminution de l'affinité pour les partenaires de la membrane interne, provoquant ainsi la dissociation de la pompe (Tikhonova & al, 2011). L'augmentation de la résistance par rapport à la souche PAO1 Δ OprM (allant jusqu'à un facteur 16 pour la ticarcilline) indique la présence d'une pompe assemblée et fonctionnelle. Il est cependant possible que les mutations du 4mut déstabilisent l'assemblage et que la pompe ne reste donc pas assemblée suffisamment longtemps pour permettre un efflux efficace.

Paradoxalement, tous les mutants (exception faite des mutants R403L et 4mut) restaurent un profil de résistance à la ciprofloxacine comparable à celui de la souche PAO1. Cet antibiotique est une fluoroquinolone qui est majoritairement effluée par les pompes MexEF-OprN et MexCD-OprJ. Ces pompes étant présentes chez la souche PAO1 Δ OprM, on se serait donc attendu à une absence de modification du profil de résistance, que le canal OprM (et par conséquent les pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM) soit présent ou non. Il a cependant été montré que le taux d'expression de la pompe MexAB-OprM est inversement proportionnel à celui des pompes MexEF-OprN et MexCD-OprJ (Li & al, 2000). La diminution de la capacité d'efflux ou d'assemblage du 4mut pourrait donc entraîner une

surexpression de la pompe MexAB et donc une diminution de l'expression des pompes MexEF-OprN et MexCD-OprJ, expliquant la baisse de résistance liée à ce mutant.

Concernant les aminoglycosides, les résultats sont très surprenants et difficiles à interpréter, ce qui était déjà le cas avec le vecteur pME6001. Les niveaux de résistance des mutants sont pratiquement tous supérieurs (d'un facteur 2 à un facteur 4), à celui de la souche sauvage PAO1, et le double mutant D416A-R419A est particulièrement résistant à la tobramycine. Comme énoncé précédemment, ceci peut être dû au fait que le vecteur de complémentation porte une résistance à un antibiotique de cette famille, la gentamicine. Néanmoins, il est intéressant de noter que le 4mut ne présente pas de perte de résistance pour les deux antibiotiques testés. Les aminoglycosides sont des antibiotiques substrats de la pompe MexXY-OprM, qui ne sont pas pris en charge par la pompe MexAB-OprM. L'augmentation de la résistance des mutants, et notamment celle du mutant 4mut pourrait indiquer une différence d'interaction d'OprM avec ses partenaires des pompes MexAB et MexXY. Les résidus modifiés conduiraient ainsi à une conformation permettant une adaptation du canal à la pompe MexXY, mais pas à la pompe MexAB.

4. Etude de la formation des complexes bipartites OMF-MFP et de l'assemblage de la pompe tripartite MexA-MexB-OprM

Les trois composants des pompes à efflux, à savoir les protéines OMF, MFP et RND s'assemblent au sein d'un complexe tripartite utilisé par les bactéries pour exporter les antibiotiques à travers les deux membranes, vers le milieu extracellulaire. Ces pompes sont impliquées dans l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et elles présentent une spécificité de substrat variable d'une pompe à l'autre, avec des substrats communs à plusieurs pompes. Elles constituent donc une cible thérapeutique intéressante.

Cependant, bien que quelques inhibiteurs de la protéine RND aient pu être mis en évidence, aucun n'a pu être transformé en molécule thérapeutique du fait de leur grande toxicité. Une approche alternative, sur laquelle nous nous focalisons au laboratoire, est de développer des molécules capables d'abolir la formation de l'assemblage, mais ceci nécessite une bonne connaissance du processus et la caractérisation des interfaces, information qui reste limitée par un faible nombre de données expérimentales disponibles sur cet aspect. Plusieurs structures de pompes entières reconstituées *in vitro* ont été résolues par cryo-microscopie électronique (Trépot & al, 2010 ; Du & al, 2014 ; Du & al, 2015 ; Kim & al, 2015 ; Daury & al, 2016). Par ailleurs, l'étude *in vitro* des interactions entre les différents partenaires de la pompe (ITC, SPR) a permis de décrire un modèle d'assemblage séquentiel en quatre étapes (Touzé & al, 2004 ; Tikhonova & al, 2011). Ces études ont montré que l'OMF (ToIC) et le transporteur RND (AcrB) peuvent former des complexes bipartites, l'interaction étant favorisée par la présence de la MFP (AcrA). Elles ont également montré que l'ancre lipidique de la MFP (AcrA) est nécessaire pour l'assemblage et que l'ouverture du canal contribue à le déstabiliser l'édifice, favorisant ainsi la dissociation de la pompe. Plusieurs modèles d'assemblage ont été décrits, impliquant soit une interaction directe entre la protéine OMF et le transporteur RND, soit une interaction indirecte médiée par la protéine MFP (voir **Chapitre I.4**).

Malgré toutes ces données, il reste des questions non résolues sur le mécanisme d'assemblage, notamment la stœchiométrie de la MFP au sein du complexe qui reste un sujet de débat, même si la plupart des données, majoritairement structurales, tendent à indiquer qu'elle forme un hexamère au sein de la pompe assemblée. Le développement

d'outils permettant d'étudier la formation de la pompe ou de suivre le transport des molécules au cours de l'efflux pourrait donc permettre d'une part une meilleure compréhension du mécanisme d'assemblage de la pompe et d'autre part, le criblage de molécules à potentiel inhibiteur, capables d'empêcher la formation de la pompe, de la dissocier ou d'inhiber son fonctionnement.

4.1. Etude de l'interaction OMF-MFP par BN-PAGE

4.1.1. Le BN-PAGE

Initialement développé pour la séparation de complexes membranaires extraits des mitochondries, dont le poids moléculaire variait entre 10 et 10 000 kDa, par Schägger et al (Schägger & Von, 1991), le BN-PAGE est de plus en plus utilisé pour la caractérisation de gros complexes multiprotéiques. Il a d'ores et déjà servi à déterminer la stœchiométrie des protéines au sein d'un complexe (Swamy & al, 2006 ; 2007) ou encore pour caractériser l'assemblage des protéines au sein d'un complexe (Meddows & al, 2001). Les protéines migrent sous forme native, uniquement en fonction de leur poids moléculaire, grâce à la présence de bleu de Coomassie, qui leur confère une densité de charge négative uniforme sans les dénaturer. Dans le cas des protéines membranaires, il ne permet pas de déterminer le poids moléculaire mais de l'estimer, car les micelles de détergents autour de la protéine modifient leur taille. Les protéines vont donc migrer plus haut que la taille attendue pour une protéine seule. Le choix des protéines de calibration revêt donc une certaine importance, et il est nécessaire, pour une bonne estimation du poids moléculaire d'avoir parmi les protéines de calibration, des protéines membranaires solubilisées dans le même détergent que les protéines étudiées. Nous avons effectué le choix de nos protéines de calibration sur la base des courbes de calibration décrites par Schägger & al (Schägger, Cramer, & von Jagow, 1994) et Ferrandez & al (Ferrandez et al., 2012).

La présence de bleu de Coomassie permet, non seulement la migration des protéines indépendamment de leur point isoélectrique (et donc uniquement en fonction de leur poids moléculaire), mais il permet aussi de limiter l'agrégation des protéines au cours de l'étape de

concentration de l'électrophorèse. En effet, la présence de plusieurs charges négatives à la surface des protéines entraîne une répulsion électrostatique qui limite ainsi le risque d'agrégation. L'une des étapes cruciales est la préparation de l'échantillon. Les cations divalents tels que le potassium interagissent avec le bleu de Coomassie, il est donc nécessaire de s'en affranchir. Ces cations sont remplacés par l'acide 6-aminohexanoïque qui permet le maintien d'une certaine force ionique dans la solution, et contribue à solubiliser la plupart des protéines, y compris les protéines membranaires.

Le choix du détergent est également important, car il est nécessaire d'utiliser un détergent non dénaturant qui préserve la conformation native de la protéine et qui la stabilise dans le gel. Le détergent doit également pouvoir être facilement remplacé par le bleu de Coomassie au cours de la migration des protéines. Pour l'analyse des complexes protéiques par BN-PAGE, notre choix s'est porté sur le DDM, un détergent non ionique qui fait partie des trois détergents recommandés pour le BN-PAGE (avec le Triton X-100 et la digitonine). Ce choix se justifie également par le fait que de précédents travaux réalisés au laboratoire (Ferrandez & al, 2012) ont montré que le β OG, bien qu'étant un détergent non ionique, n'est pas adapté pour cette technique, entraînant l'agrégation des protéines. Ce phénomène s'explique, selon les auteurs, par un mauvais échange entre ce détergent et le bleu de Coomassie. Ces mêmes travaux ont montré que le DDM permet de minimiser le phénomène d'agrégation non spécifique. En conséquence, les protéines OMFs, normalement purifiées en présence de β OG car elles ne cristallisent qu'en présence de ce détergent, ont été purifiées en DDM pour les expériences de BN-PAGE. Toutes les protéines sont donc purifiées dans du DDM et ce détergent est également ajouté au gel.

4.1.2. Caractérisation des complexes

Nous avons choisi de caractériser les pompes à partir de complexes bipartites OMF-MFP car les mesures d'interaction (ITC, SPR) ont montré que ce complexe forme l'interaction bipartite la plus stable (Touzé & al, 2004 ; Tikhonova & al, 2011). Afin d'étudier l'interaction des protéines de la pompe au sein de ces complexes bipartites, les protéines OMF (OprN,

OprM) et MFP (MexE, MexA et MexX) ont été purifiées et incubées ensemble à différents ratios (1 : 1 / 1 : 2 / 1 : 3 et 1 : 6). Les complexes formés sont analysés par BN-PAGE, avec les protéines individuelles servant de référence. Les précédents travaux de Monlezun & al, portant d'une part sur l'étude de l'interaction d'OprM avec son partenaire MFP MexA et d'autre part sur la stœchiométrie de la MFP, ont montré que la fixation de la MFP sur l'OMF se fait uniquement par multiples de 2, tendant ainsi à confirmer l'existence d'un dimère comme unité fonctionnelle de la MFP (Ferrandez & al, 2012). Ces travaux ont également montré que l'OMF peut fixer jusqu'à 8 molécules de MFP, et que la présence de la queue lipidique sur la cystéine N-terminale était nécessaire à la formation du complexe.

L'analyse de l'interaction entre OprM et son autre partenaire MFP MexX (**Fig. 105**) confirme ces résultats car on retrouve une bande supplémentaire par rapport aux protéines seules. L'apparition de nouvelles bandes, absentes du profil de migration des protéines seules, correspond à la formation de complexes. Les bandes supplémentaires (bandes a, b, c, e, **Fig. 105**) correspondent à un trimère d'OprM (considéré par la suite comme une molécule dans la description des ratios) ayant fixé un dimère de la MFP correspondante, soit un complexe de ratio 1 : 2. Les pistes 2 à 5 correspondent aux différents ratios testés pour les complexes OprM-MexX (**Fig. 105**), les pistes 6 et 7 correspondant aux protéines seules qui migrent respectivement sous forme de trimères (OprM) et de dimères (MexX), comme décrit précédemment pour OprM et MexA (Ferrandez & al, 2012). L'interaction entre OprN et son partenaire MFP MexE a également été analysée, mais le profil de migration d'OprN est cependant affecté par le fait que la protéine a été purifiée en β OG et non en DDM, montrant la présence de nombreuses bandes, et n'a donc pas pu être interprété (non présenté). De nouvelles analyses sont en cours à partir de la protéine purifiée en DDM.

Un complexe de ratio 1 : 4 pourrait être présent pour OprM et MexX mais la présence d'une bande correspondant à un oligomère d'OprM, qui migre à la taille attendue pour ce complexe, ne permet pas de trancher (**Fig. 105**). On note également la présence d'une bande supplémentaire (bande d, **Fig. 105**) pouvant correspondre à des complexes 1 : 6 entre OprM et MexX. Ces résultats tendent à confirmer la fixation de la MFP sur l'OMF par multiples de 2. Une analyse en deuxième dimension sur gel SDS-PAGE de ces complexes sera cependant nécessaire afin de déterminer la composition exacte des complexes formés. Il sera

cependant difficile d'analyser les bandes correspondant aux complexes 1 : 6 entre l'OMF et la MFP car elles sont de très faible intensité.

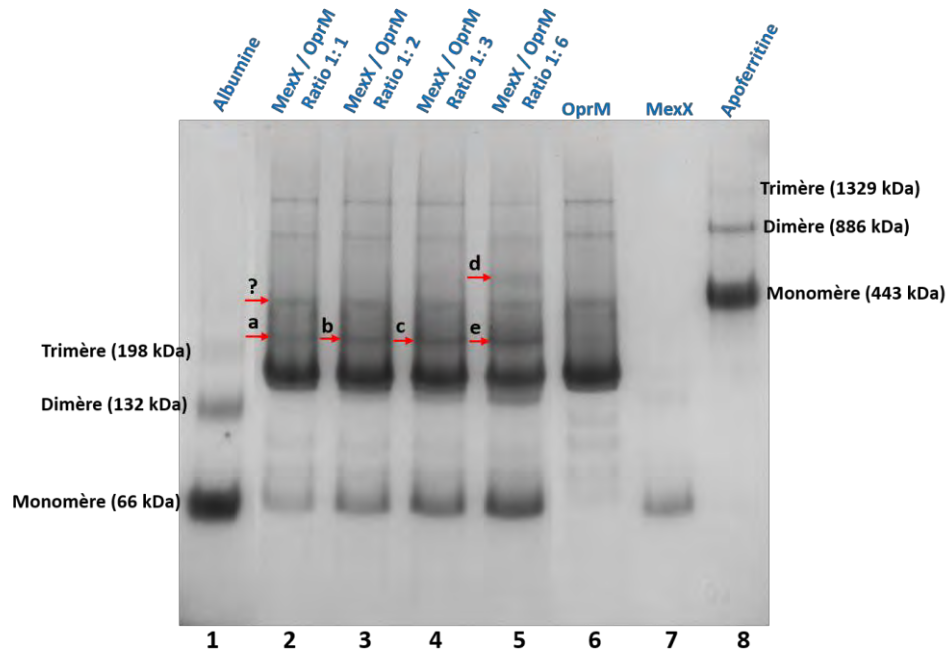


Figure 105 : Analyse des complexes OprM-MexX par BN-PAGE. Les ratios sont établis en considérant le canal trimérique OprM et la MFP MexX monomérique respectivement comme une seule molécule. L'albumine et l'Apoferritine servent de marqueurs de poids moléculaire.

Par ailleurs, le canal OprM est à l'instar de son analogue TolC d'*E. coli*, une protéine versatile. Il est en effet recruté par plusieurs pompes, parmi lesquelles les pompes MexAB, MexXY, MexJK, MexVW et la pompe MexMN. Nous avons donc voulu analyser la capacité d'OprM à interagir avec la pompe MexEF et en parallèle, la capacité du canal OprN à interagir avec les pompes MexAB et MexXY, afin d'étudier l'interchangeabilité des partenaires au sein des pompes.

Afin d'étudier les complexes bipartites OMF-MFP, les protéines ont été purifiées et incubées comme décrit précédemment. Les complexes bipartites suivants sont réalisés à un ratio OMF-MFP 1 : 6 : OprM-MexE, OprN-MexA et OprN-MexX. Seuls les résultats

correspondant au complexe OprM-MexE seront présentés, la migration d'OprN étant affectée comme décrit précédemment. La piste 2 correspond au complexe bipartite, les pistes 3 et 4 correspondant aux protéines seules (**Fig. 106**). On retrouve les mêmes bandes que précédemment, correspondant au complexe 1 : 2 (bande c) et au complexe 1 : 6 (bande a), ce qui montre que MexE peut interagir avec OprM qui n'est pourtant pas son partenaire natif. Les mêmes analyses sont en cours pour les complexes OprN-MexA et OprN-MexX, à partir de la protéine purifiée en DDM. La bande b pourrait correspondre au complexe 1 : 4. Ces résultats préliminaires semblent indiquer que les partenaires des deux pompes peuvent être échangés. Cependant, des études fonctionnelles réalisées à partir de pompes chimériques OprM-MexEF et OprN-MexAB ont montré que si OprM est capable de fonctionner avec la pompe MexEF, ce n'est pas le cas pour OprN car la pompe OprN-MexAB n'est pas fonctionnelle (Maseda & al, 2000).

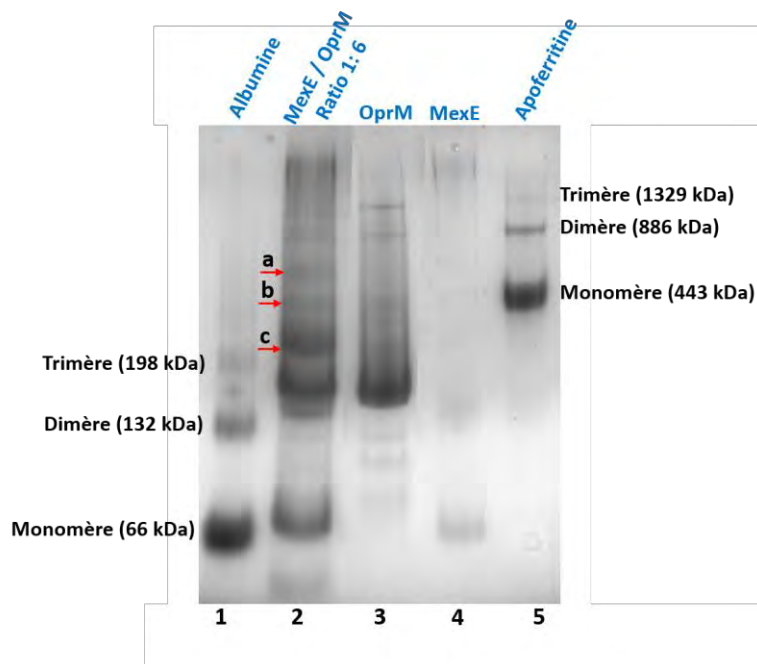


Figure 106 : Analyse du complexe OprM - MexE par BN-PAGE.

L'interaction OMF-MFP au sein de la pompe semble donc être régie par des mécanismes subtils et la reconnaissance OMF-MFP semble primordiale pour le bon fonctionnement de la pompe. Daury & al ont d'ailleurs montré en reconstituant des pompes entières *in vitro*, que la pompe chimérique OprM-AcrA-MexB se forme dans une proportion plus faible que les pompes natives OprM-MexAB ou TolC-AcrAB. Cette reconnaissance implique sans doute des résidus spécifiques qui sont propres à chaque pompe et qui, suivant leur nature, permettent une adaptation plus ou moins importante à différents partenaires. Il serait intéressant de réaliser des expériences de cross-link, à l'instar de celles qui ont été réalisées pour la pompe TolC-AcrAB d'*E. coli*, afin de caractériser les zones d'interaction entre ces différentes OMFs et leurs partenaires MFPs.

Sur la base des travaux ayant permis de déterminer la surface d'interaction entre AcrA et TolC chez *E. coli* (Lobedanz & al, 2007) dans le modèle court d'assemblage, il a été montré que la surface d'interaction de la MFP avec l'OMF correspond au domaine α de la MFP et au domaine coiled-coil de l'OMF, au niveau de crevasses formées notamment par les hélices externes H3 et H7 et l'hélice interne H8. Nous avons comparé les séquences de nos trois MFPs sur cette région. Ces domaines α sont de longueur comparable à l'exception de MexA, mais cependant peu conservé, avec 29,8% et 36,8% d'identité de séquence entre MexX et MexA, et MexE et MexA respectivement, et 24,2% entre MexX et MexE. L'alignement de séquence montre la présence d'un motif conservé, L-XXXX-A(V/I)S (**Fig. 107**) localisé entre les deux hélices du domaine α . La comparaison de ces domaines (issus de la structure de MexA ou de modèles provenant de la banque de modèles protéiques (Protein Model Portal) <http://www.proteinmodelportal.org/query/uniprot/Q9ZNG9> pour MexX et <http://www.proteinmodelportal.org/query/uniprot/Q9I0Y9> pour MexE) avec celui d'AcrA, montre quelques acides aminés conservés parmi ceux décrits comme impliqués dans l'interaction avec l'OMF, dont ceux du motif pré-cité (**Fig. 107**).

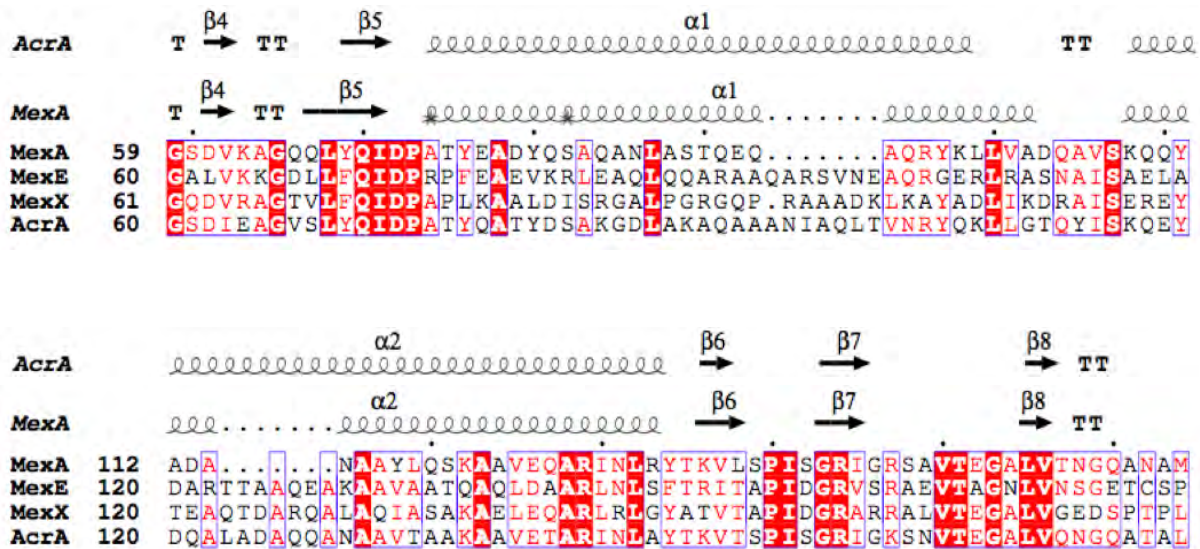


Figure 107 : Alignement multiple des séquences des domaines α (coiled-coil) des MFPs de *P. aeruginosa* (MexA, MexE et MexX) et d'*E. coli* (AcrA). Les résidus conservés sont indiqués en rouge et les structures secondaires correspondant aux deux hélices α du domaine α d'AcrA et de MexA sont représentées au-dessus des séquences.

Néanmoins, la majorité des résidus n'est pas conservée. Cette différence, à des positions équivalentes entre les MFPs, pourrait expliquer la spécificité d'interaction avec l'OMF. En effet, on peut noter que la surface d'interaction de MexE semble impliquer majoritairement des résidus polaires et chargés, tandis que la surface d'interaction de MexX semble impliquer un mélange de résidus hydrophobes et de résidus aromatiques (**Fig. 108**). La surface d'interaction de MexA contient quant à elle aussi bien des résidus hydrophobes que chargés.

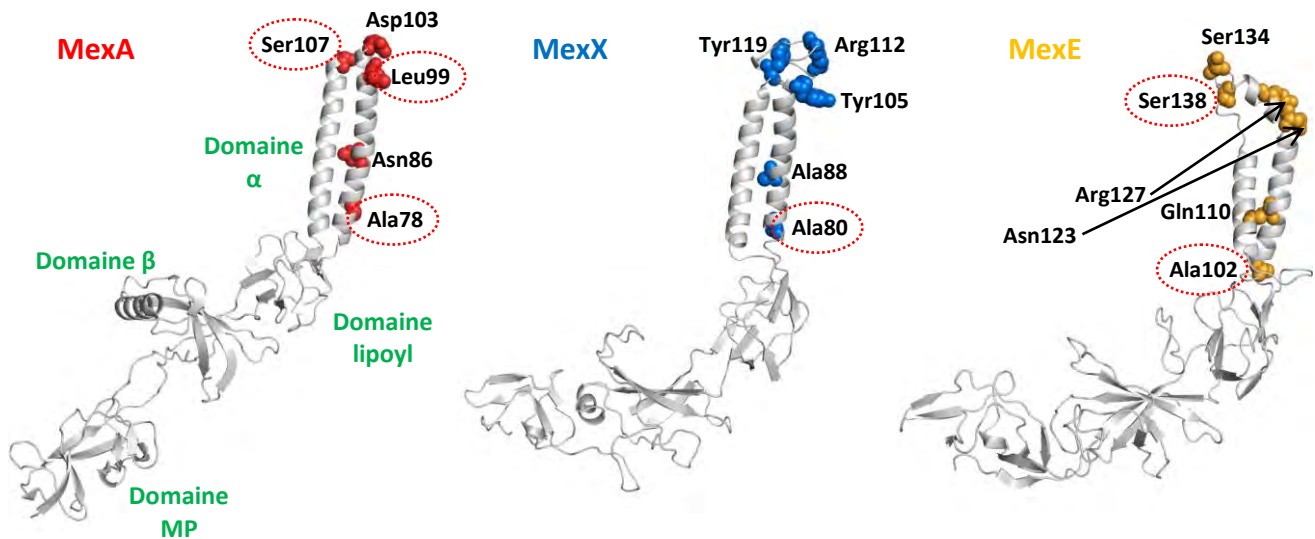


Figure 108 : Identification des résidus de la surface d'interaction des MFPs potentiellement impliqués dans l'interaction avec l'OMF. Quelques résidus conservés appartenant à la surface d'interaction sont encerclés. Les modèles de MexX et MexE proviennent de la banque de modèles protéiques (Protein Model Portal) (code PSI de MexX : Q9ZNG9; code PSI de MexE : Q9I0Y9). Code PDB de MexA : 2V4D.

La nature des résidus impliqués dans l'interaction pourrait être d'autant plus importante que la surface d'interaction diffère également au sein des OMFs. La comparaison de la surface d'interaction d'OprM et d'OprN avec celle de TolC montre la présence de deux résidus dont la nature varie entre les deux OMFs (**Fig. 109**), OprM contient un résidu hydrophobe, Leu191, qui est remplacé par un résidu chargé chez OprN, le résidu Glu179 et un résidu chargé, Thr406, qui est remplacé par un résidu hydrophobe chez OprN, le résidu Ileu395. De plus, la stabilisation de l'interaction semble impliquer plus de résidus hydrophobes chez OprN (Leu171 et Val377) que chez OprM (Leu182).

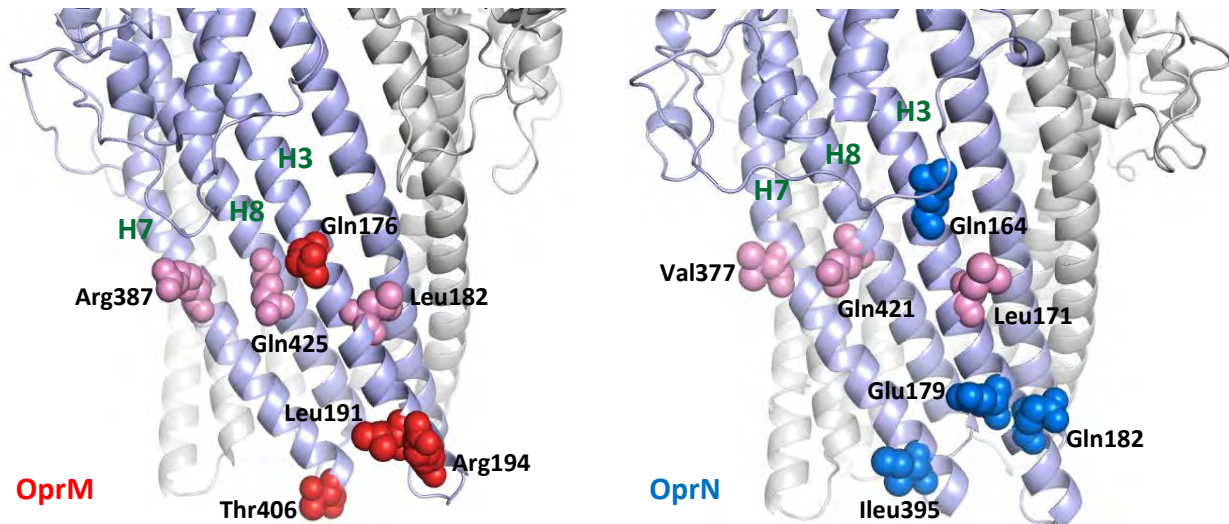


Figure 109 : Identification des résidus de la surface d'interaction des OMF potentiellement impliqués dans l'interaction avec la MFP. Seul un des monomères est représenté (en violet). Les résidus potentiellement impliqués dans l'interaction d'OprM avec ses partenaires MFPs sont indiqués en rouge et ceux impliqués dans l'interaction d'OprN avec son partenaire MFP sont indiqués en bleu. Les résidus qui pourraient être impliqués dans la stabilisation de l'interaction sont indiqués en rose. (Code PDB d'OprM : 3D5K et d'OprN : 5IUJ).

Cette analyse étant cependant basée sur une comparaison à partir de modèles structuraux, une caractérisation plus poussée de ces résidus à l'aide de techniques appropriées (mutagenèse dirigée, cross-link, cristallographie aux rayons X, ITC) devrait permettre de caractériser les zones d'interaction entre l'OMF et la MFP chez *P. aeruginosa*. L'identification des résidus impliqués devrait apporter un éclairage nouveau sur les paramètres qui régissent la spécificité d'interaction entre l'OMF et la MFP. Cette analyse pourra être étendue au complexe bipartite MFP-RND et à la pompe entière.

4.2. Reconstitution de la pompe tripartite MexA-MexB-OprM en protéoliposomes

Chez *P. aeruginosa*, la pompe constitutive MexA-MexB-OprM est la pompe la mieux caractérisée. Verchère et al (Verchère & al, 2015) ont mis au point un protocole permettant

de suivre le transport à travers cette pompe reconstituée en protéoliposomes grâce à des sondes fluorescentes, notamment le bromure d'éthidium (BET) et la pyranine (voir article, **page 239**).

Les protéines (OprM, MexA et MexB) purifiées par nos soins, ont été utilisées pour la reconstitution en protéoliposomes. OprM a été reconstituée au sein de protéoliposomes ayant encapsulé de l'ARN (ref-f). Verchère & al ont montré que MexB présente une activité basale qui augmente en présence de MexA. Les deux protéines ont par conséquent été reconstituées ensemble au sein des mêmes protéoliposomes avec encapsulation de pyranine.

Afin de suivre le transport, les deux types de protéoliposomes ont été incubés en présence de bromure d'éthidium (BET). Le BET est un agent intercalant des acides nucléiques. C'est également un substrat de MexB qui s'insère spontanément dans les membranes. Il constitue un indicateur de la reconstitution de la pompe car la fluorescence du BET augmente lorsqu'il s'insère dans la molécule d'ARN (ou d'ADN). L'augmentation de la fluorescence indique donc le transport du BET hors des liposomes contenant MexB-MexA vers les liposomes contenant OprM où il a pu s'insérer dans la molécule d'ARN encapsulée. La force protomotrice étant nécessaire pour le fonctionnement du transporteur MexB, la pyranine encapsulée sert également d'indicateur de transport car sa fluorescence diminue lorsque la concentration en protons augmente.

L'interaction entre les différents partenaires au cours de l'assemblage a ensuite été analysée par co-précipitation par pull-down. Les protéoliposomes MexB-MexA ont été reconstitués avec différentes formes de MexA et de MexB, notamment les formes sauvage (acylée) et soluble de MexA et la forme sauvage de MexB ainsi qu'un mutant non fonctionnel de MexB (D407N). Ce mutant porte une mutation d'un résidu impliqué dans le réseau de protons, empêchant ainsi le transfert de protons et donc l'utilisation de la force protomotrice par le transporteur. Des protéoliposomes contenant MexB seule ont également été préparés. Tous les liposomes contenant les différentes formes de MexB (et/ou MexA) ont été préparés à partir de lipides biotinylés, ce qui permet la purification ultérieure de ces protéoliposomes, ainsi que celle d'éventuels partenaires entraînés par pull-down, à l'aide de billes magnétiques. Les complexes précipités sont analysés sur gel SDS-PAGE.

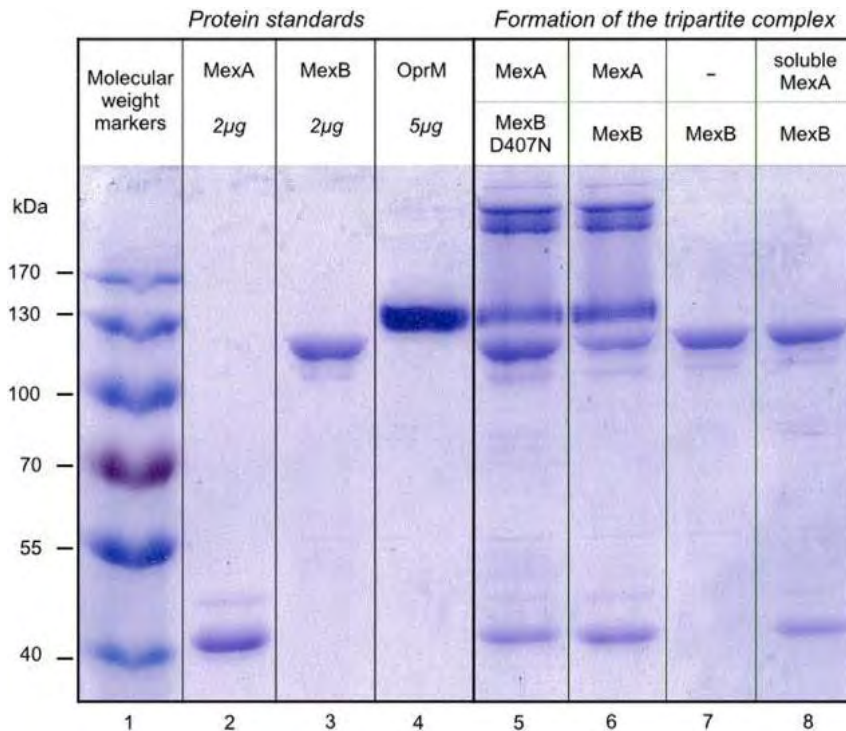


Figure 110 : Identification des complexes formés après co-précipitation par pull-down. Le puits 1 correspond au marqueur de poids moléculaire. Les protéines purifiées MexA, MexB et OprM servent de référence (respectivement puits 2, 3 et 4). Les protéoliposomes contenant MexA et MexB (puits 6), MexA et le mutant D407N de MexB (puits 5), MexB seule (puits 7) ou encore MexB en présence d'une forme soluble de MexA (puits 8) ont été incubés avec des protéoliposomes contenant OprM. Les complexes précipités ont été analysés sur gel SDS-PAGE. (Adapté de Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015, *Frontiers in Microbiology*).

Les résultats (**Fig. 110**) montrent que la MFP est nécessaire pour l'interaction entre l'OMF et la RND. En effet, les liposomes contenant OprM ne sont pas précipités en présence de liposomes contenant uniquement MexB. Par contre, en présence de MexA, on retrouve les trois protéines au sein des complexes précipités.

Ils montrent d'autre part que l'ancre lipidique est nécessaire pour l'interaction de la MFP avec l'OMF mais pas avec la RND. La reconstitution de la pompe montre en effet qu'OprM n'est pas précipité avec MexB en présence de la forme soluble de MexA. Par contre, les précipités obtenus montrent la présence de la forme soluble de MexA au sein du

complexe, ce qui montre que l'absence de l'ancre lipidique n'affecte pas l'interaction avec MexB.

Par ailleurs, l'analyse de l'effet de la force protomotrice sur l'assemblage à l'aide d'un mutant de MexB muté au niveau du réseau de protons (D407N) a montré que l'assemblage se fait de façon indépendante du transfert de protons. Les trois protéines, parmi lesquelles le mutant D407N de MexB, sont présentes au sein des complexes précipités, indiquant ainsi que la force protomotrice n'est pas nécessaire pour l'assemblage.

Par contre, la force protomotrice est nécessaire pour la dissociation de la pompe. En effet, l'analyse de complexes précipités à partir de liposomes contenant de la pyranine (protéoliposomes MexB-MexA) et de liposomes contenant des molécules d'ARN (protéoliposomes OprM), incubés en présence de BET, montrent que OprM n'est plus précipité lorsque la pompe atteint un état de saturation tandis que les trois protéines sont précipitées lorsque la forme sauvage de MexB est remplacée par le mutant D407N au sein du protéoliposome (**Fig. 111**).

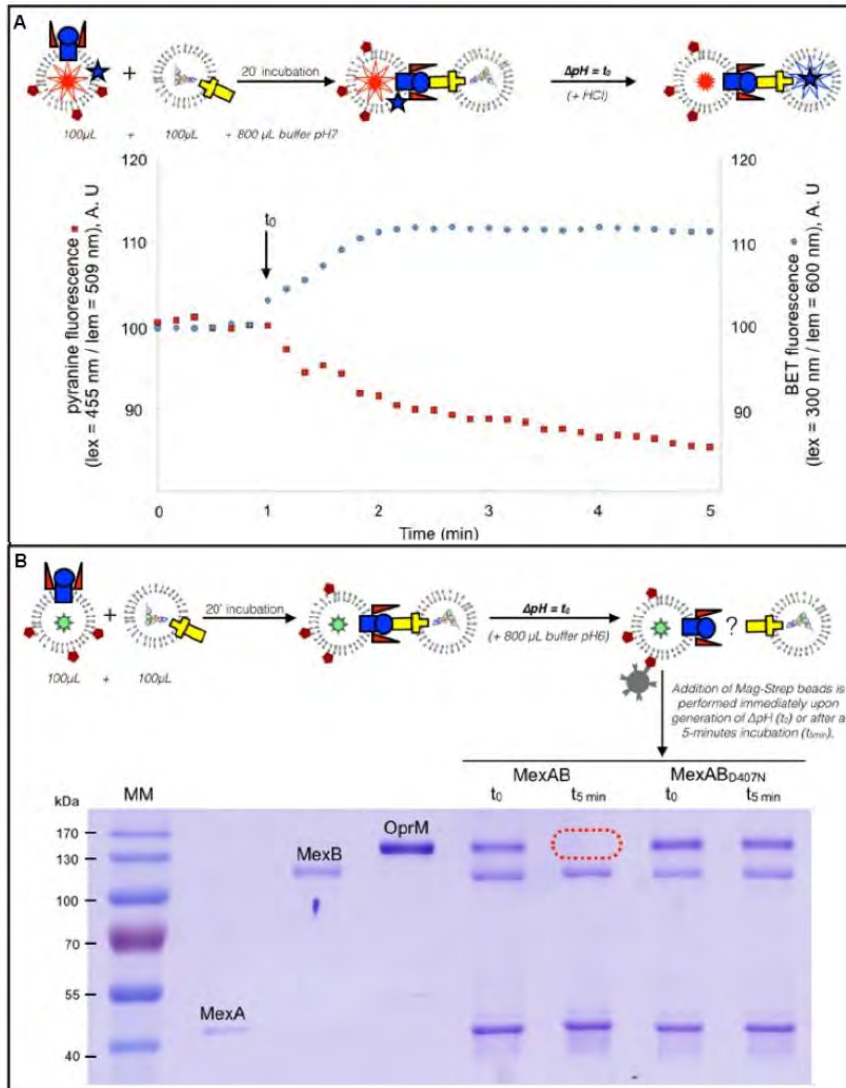


Figure 111 : Adaptation de la précipitation par pull-down aux conditions de transport. Le transport, réalisé à l'aide de la pompe MexB-MexA-OprM reconstituée à partir de protéoliposomes contenant respectivement OprM et MexA-MexB, est suivi à l'aide de deux sondes fluorescentes, le bromure d'éthidium (BET) et la pyranine (A). La variation concomitante de la fluorescence du BET (en bleu) et de la pyranine (en rouge) est un indicateur du transport d'une vésicule à l'autre. Afin de déterminer la cinétique d'assemblage de la pompe, le pull-down est ensuite réalisé dans les mêmes conditions de transport (B) à partir de protéoliposomes enrichis en lipides biotinylés qui permettent de précipiter les complexes à l'aide de billes magnétiques. Les complexes sont réalisés comme indiqués précédemment. (Adapté de Ntsogo Enguéné, Verchère & al, 2015, Frontiers in Microbiology).

Catch me if you can: a biotinylated proteoliposome affinity assay for the investigation of assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*

OPEN ACCESS

Edited by:

Klaas M. Pos,
Goethe University Frankfurt, Germany

Reviewed by:

Vishvanath Tiwari,
Central University of Rajasthan, India
Dinesh Sriramulu,
Shres Consultancy (Life Sciences),
India
Markus Seeger,
University of Zurich, Switzerland

*Correspondence:

Martin Picard,
Laboratoire de Cristallographie
et RMN Biologiques, Faculté
de Pharmacie de Paris, UMR 8015
CNRS – Université Paris 089
Descartes, 4, Avenue de
l'Observatoire, 75270 Paris Cedex
06, France
martin.picard@parisdescartes.fr

† These authors have
contributed equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 February 2015

Accepted: 16 May 2015

Published: 02 June 2015

Citation:

Enguéné VYN, Verchère A, Phan G,
Broutin I and Picard M (2015) Catch
me if you can: a biotinylated
proteoliposome affinity assay for the
investigation of assembly of the
MexA-MexB-OprM efflux pump from
Pseudomonas aeruginosa.
Front. Microbiol. 6:541.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00541

Véronique Yvette Ntsogo Enguéné[†], Alice Verchère[†], Gilles Phan, Isabelle Broutin and Martin Picard*

Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR 8015 CNRS – Université Paris 089 Descartes, Paris, France

Efflux pumps are membrane transporters that actively extrude various substrates, leading to multidrug resistance (MDR). In this study, we have designed a new test that allows investigating the assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from the Gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. The method relies on the streptavidin-mediated pull-down of OprM proteoliposomes upon interaction with MexAB proteoliposomes containing a biotin function carried by lipids. We give clear evidence for the importance of MexA in promoting and stabilizing the assembly of the MexAB-OprM complex. In addition, we have investigated the effect of the role of the lipid anchor of MexA as well as the role of the proton motive force on the assembly and disassembly of the efflux pump. The assay presented here allows for an accurate investigation of the assembly with only tens of microgram of protein and could be adapted to 96 wells plates. Hence, this work provides a basis for the medium-high screening of efflux pump inhibitors (EPIs).

Keywords: multidrug resistance, efflux pump, membrane protein, proteoliposome, macro-molecular assembly

Introduction

In Gram-negative bacteria, efflux transporters play a major role in the emergence of antibiotic resistance thanks to their ability to export drugs out of the cell (Nikaido, 2009). They are organized as tripartite systems where the RND pump (member of the Resistance, Nodulation, cell Division family) is located in the inner membrane and works in conjunction with a periplasmic protein belonging to the MFP family (Membrane Fusion Protein family), and an outer membrane channel (from the OMF, outer membrane factor family). The cytoplasmic inner membrane protein acts as an energy-dependent pump with broad substrate specificity. The outer membrane protein acts as a porin whereas the third one is thought to stabilize the whole complex. The understanding of these pumps has been largely improved thanks to the publication of high-resolution structures of the various components (Hinchliffe et al., 2013) but the overall mechanism of assembly as well as the stoichiometry of assembly is still a matter of controversy. Two main models have been suggested for a complete

Abbreviations: β OG, beta-octyl glucopyranoside; DDM, dodecyl maltoside; EthB, Ethidium bromide. DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPE, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; RND, Resistance, Nodulation, cell Division family; OMF, outer membrane factor family; MFP, Membrane Fusion family; ITC, isothermal titration calorimetry; SPR, surface plasmon resonance.

description of the pump assembly. In the first one there is a direct docking of the RND protein on the OMF. In this model, three or six copies of the MFP stabilize the complex. This direct docking model has been comforted by the characterization of a direct interaction between AcrB and TolC by cross-linking (Tamura et al., 2005; Symmons et al., 2009; Weeks et al., 2010) and by *in vitro* surface plasmon resonance (SPR; Tikhonova et al., 2011). A second model where the MFP, assembled in a funnel-like conformation with a stoichiometry of 6- 12 copies acts as a bridge between the RND and the OMF, has been comforted by recent electron microscopy studies (Trépout et al., 2010; Du et al., 2014; Kim et al., 2015). This controversy builds up on a series of biochemical and biophysical characterizations. Indeed it is known for long that a genuine tripartite complex can be purified, without prior cross-linking, simply by using a hexahistidine tag on each of the proteins (Tikhonova and Zgurskaya, 2004). The assembly can be also studied *in vivo*, by screening mutants and assessing their ability to restore resistance against antibiotics (see, e.g., Nehme and Poole, 2007) or by taking advantage of the sensitivity of bacterial cells to vancomycin, a very large antibiotic that cannot penetrate the cell by slow passive diffusion (Bavro et al., 2008): Gram negative bacteria are not sensitive to vancomycin but become so if the OMF were to open upon assembly, thereby allowing the antibiotic to diffuse inside the cell. This strategy has been used to study the efflux pump MtrC-MtrD-MtrE (respectively MFP-RND-OMF) from *Neisseria gonorrhoea* (Janganan et al., 2013). The assembly has also been studied *in vitro* by isothermal titration calorimetry (ITC), a technique that allowed for the evaluation of the affinity between components and the establishment of a four-stage model where four sequential, non-cooperative, binding sites are suggested (Touzé et al., 2004). Following similar lines, the assembly of the whole complex has been studied by (SPR; Tikhonova et al., 2011). Upon injection of the protein partners (premixed or in a sequenced manner) on a biochip onto which AcrB was adsorbed, they could monitor assembly in real time. The tripartite complex successfully formed only when the partners were mixed in following a specific sequence of events.

In spite of the valuable and continued efforts for understanding how a tripartite efflux pump assembles, the development of original solutions compatible with medium-high screening of inhibitors is lacking. Antibiotic resistance is an increasing threat complicated by the scarcity of new anti-infective drug families under development. Hence, finding new ways to inhibit efflux pumps is a very promising and important endeavor because it was shown that such inhibitors restore the activity of antibiotics (Lomovskaya et al., 2006; Pages and Amaral, 2009). Lately, we have described a new protocol where transport through the whole pump could be monitored by use of proteoliposomes and respective fluorescent probes liable to report the activity of each partner of the pump (Verchère et al., 2015). As a complementary approach we present here a new strategy that allows investigating the formation of efflux pumps.

Materials and Methods

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl);

DOPE, cap biotin) were purchased from Avanti Polar Lipids (reference: 850375C and 870273C, respectively). SM₂ Bio-beads were obtained from Bio-Rad (reference 152-3920). n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) and n-octyl- β -D-glucopyranoside (β -OG) was purchased from Anatrace (reference D310LA and O311, respectively).

Production, Purification of MexB

MexB was purified following the protocol described in (Mokhonov et al., 2005), with minor modifications. Heterologous expression was performed in a C43 Δ AcrB strain. A pre-culture was grown overnight at 37°C under agitation at 200 rpm and inoculated at OD_{600nm} = 0.05 in 2xTY medium containing 100 μ g/mL of ampicillin. Cell were grown to OD_{600nm} = 0.6 at 30°C at 200 rpm and then cooled down at 4°C for 30 min. Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) was added (1 mg/mL final) and growth was continued overnight at 20°C. Cells were then lysed thanks to a cell-disrupter (Cell-D from Constant LTD) at 4°C after two passages at 2.4 kbar. Membranes were collected upon centrifugation at 100,000 g during 1 h at 4°C. Solubilization was performed overnight at 4°C in 10 mM Bis-Tris pH 7.4; glycerol 20%, 10 mM imidazole and 500 mM NaCl at a 2:1 detergent-to-protein ratio (protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid test from Sigma). Purification was performed by affinity chromatography followed by a gel filtration (superose 6 HR, GE).

Production, Purification of MexA

MexA was purified following the protocol described in (Akama et al., 2004) with minor modifications. Heterologous expression was performed in a C43 Δ AcrB strain. A pre-culture was grown overnight at 37°C under agitation at 200 rpm and inoculated at OD_{600nm} = 0.05 in 2xTY medium containing 25 μ g/mL of chloramphenicol. Cell were grown to OD_{600nm} = 0.6 at 30°C at 200 rpm and then cooled down at 4°C for 30 min. Arabinose was added (0.02% final, w/v) and growth was continued during 2.5 h at 30°C. Cells were then lysed thanks to a cell-disrupter (Cell-D from Constant LTD) at 4°C after two passages at 2.4 kbar. Membranes were collected upon centrifugation at 100,000 g during 1 h at 4°C. Solubilization was performed overnight at room temperature in 20 mM Tris-HCl pH 8, glycerol 10%, 15 mM imidazole at a 40:1 detergent-to-protein ratio (protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid test from Sigma). Purification was performed by affinity chromatography followed by a gel filtration (superose 6 HR, GE). A truncated form of MexA “cysteine-less,” named MexAnp, without its first 24 residues, has been generated in the laboratory in order to produce and purify a non-palmitoylated, soluble version of the protein.

Production, Purification of OprM

OprM is purified following the protocol described in (Phan et al., 2010) with minor modifications. In brief, the procedure was exactly that described above for MexA except that an additional solubilization step is added on the membrane pellet: N-octylpolyoxyethylene (C₈POE) is added (2% final, w/v) and the mixture was incubated 30 min at 37°C. C₈POE is a detergent

that has been shown to specifically solubilize bacterial inner membranes.

Production, Purification of the RNA Scaffold

Purification of the RNA scaffold, dubbed ref-f, was performed as described in Ponchon et al. (2013). Heterologous expression was achieved in XL1 cells. A pre-culture was grown 10 h at 37°C under shaking at 200 rpm and inoculated at $OD_{600nm} = 0.05$ in LB medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ of ampicillin. Cells were grown overnight to $OD_{600nm} = 3$ at 37°C at 200 rpm. The expression of ref-f is induced by the addition of 1 mM of IPTG. After 3 h, cells were centrifuged at 7000 g, during 20 min at room temperature. Pellets were re-suspended in 1 L of buffer containing 20 mM Tris, 200 mM NaCl and centrifuged at 7000 g, during 20 min, again at room temperature. Pellets were re-suspended in 40 mM of MgSO_4 , 50 mM $\text{Na}_3\text{Citrate}$ pH 5.6. RNA was extracted upon incubation with 40 mL of phenol during 2 h under gentle stirring at room temperature. The mixture was centrifuged 15 min at 3200 g. The supernatant was incubated with two volumes of ethanol and 1/20 of NaCl 5 M, a precipitate was formed and the mixture was centrifuged 5 min at 3200 g. The pellet was dried under the fume hood for 5 min and 10 mL of distilled water was added. The RNA was then purified by anion exchange chromatography.

Preparation of Unilamellar Vesicles

A mix of lipids consisting of DOPC and DOPE with cap biotin at a 20:1 w/w ratio were dissolved in 25 mM HEPES pH7, 100 mM K_2SO_4 and 2 mM MgSO_4 , to a final concentration of 1 mg/mL. The suspension was then heated for 10 min at 37°C. This solution was then sonicated for 10 min with 30' pulse/30' pause cycles. Liposomes were subsequently passed through 200 nm membranes and then 100 nm membranes thanks to an extruder from Avanti (20 pass for each type of membrane). The homogeneity of the suspension was controlled by Dynamic Light scattering (DLS, Nanosizer Malvern).

Reconstitution of the Proteins

Liposomes were first solubilized at a 1:1 detergent to lipid ratio (w/w). Solubilization was performed using β -OG for 1 h at 20°C under gentle agitation. Proteins were added to the solubilized liposome suspension at the following lipid-to-protein ratio (w/w): MexB 1:20; MexA, 1:30; OprM, 1:20. OprM proteoliposomes were prepared in the presence of ref-f at 3 mg/ml: MexAB proteoliposomes were prepared in the presence of 3 mM pyranine. Detergent removal was achieved upon 3 consecutive additions of Bio-beads (previously washed with methanol, ethanol and water) at a Bio-bead: detergent ratio of 20 (w/w) for at 1 h at 20°C, followed by an eventual addition, overnight, at the same ratio. MexAB proteoliposomes were purified from untrapped pyranine using a PD-10 desalting column (GE Healthcare). OprM proteoliposomes were purified from untrapped RNA using source Q column (GE Healthcare).

The efficiency of the reconstitution is controlled by running a discontinuous sucrose gradient formed of five layers (60, 20, 10, 5 and 2.5% sucrose). After ultracentrifugation of liposomes on this sucrose gradient overnight at 100,000 g, non-incorporated

proteins are found at the bottom of the tube, while proteoliposomes are trapped at a sucrose interface that corresponds to their intrinsic density. Empty liposomes are recovered higher in the gradient. Different gradient fractions are collected gently and analyzed on SDS-PAGE using Coomassie staining.

Ethidium Bromide Transport

Ethidium bromide (EthB) transport was measured as previously described (Verchère et al., 2015). Fluorescence measurements were conducted at 25°C using a SAFAS-Xenius spectrofluorimeter. The measurements were performed using the dual-wavelength mode, with excitation and emission wavelengths set at 300 nm and 600 nm, respectively, for the recording of EthB fluorescence and at 455 nm and 509 nm for the recording of pyranine fluorescence. Bandwidths were set at 10 nm. 100 μL of OprM proteoliposomes and 100 μL of MexAB proteoliposomes were mixed and diluted with 800 μL of the liposome reconstitution buffer (25 mM HEPES pH7, 100 mM K_2SO_4 , 2 mM MgSO_4). The system was then incubated until a steady baseline was obtained. EthB was then added at 5 μM and a pH jump was performed after 20 min incubation.

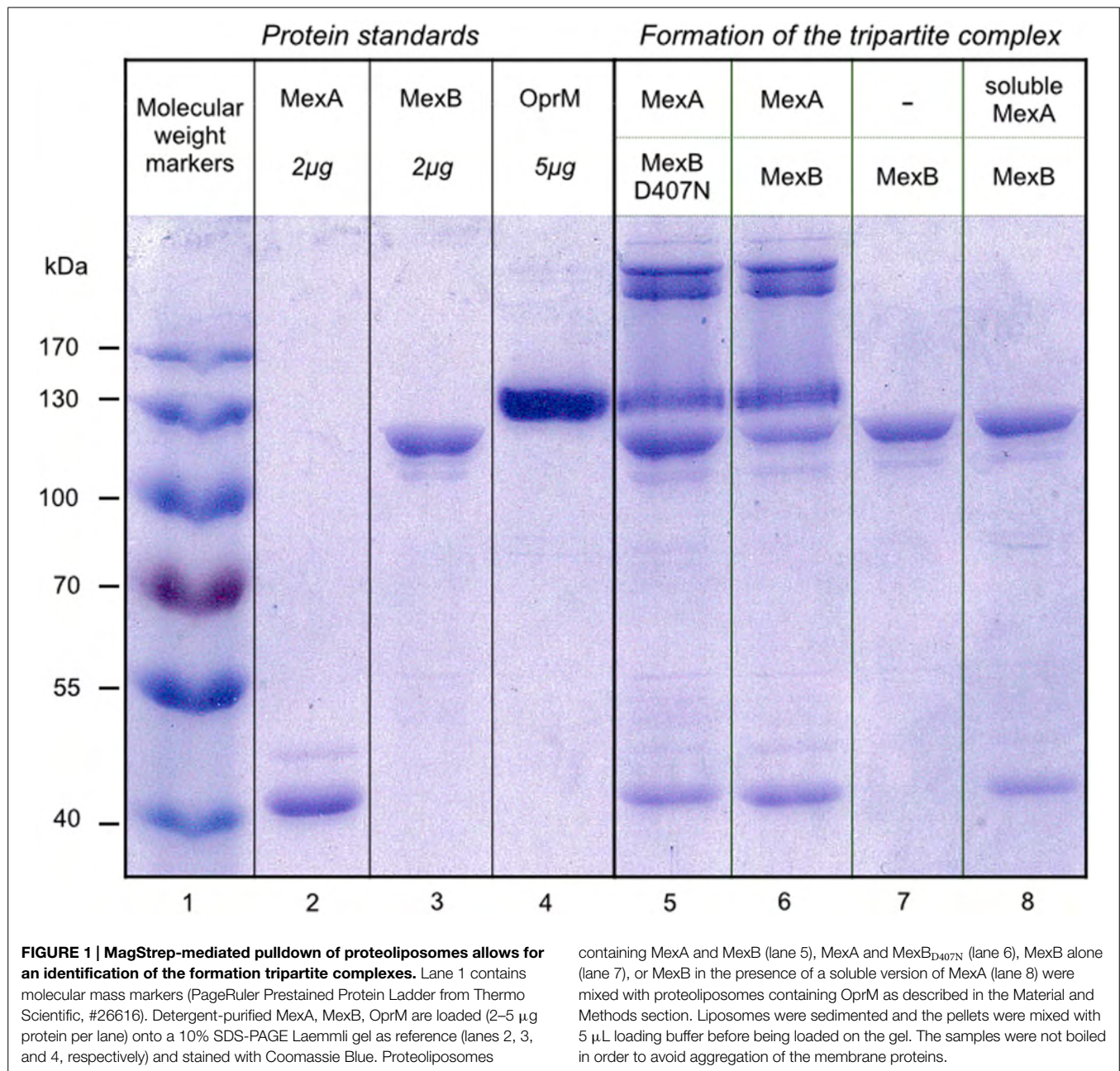
Pull Down Assay

100 μL of the respective liposomes were mixed and the suspension was then complemented with 800 μL of the liposome reconstitution buffer (25 mM HEPES pH7, 100 mM K_2SO_4 , 2 mM MgSO_4), when the assembly is performed under non-energized conditions (see § Investigation of the assembly) or with 800 μL of a buffer containing 20 mM Mes Tris pH6, 100 mM K_2SO_4 , 2 mM MgSO_4 when the assembly is performed under pH gradient conditions (see § Liposome pull down as a complementary approach to a transport assay, below). Both buffers have been tuned in order to have the same osmolarity, as measured by a cryoscopic Osmometer (Fisher Scientific, reference: 11900557). Then, the liposomes are incubated for 20 min at room temperature. Finally, 5 μL of MagStrep resin (MagStrep "type2HC" high capacity beads, IBA) at 5% (50 mg/mL) was added and the suspension was then placed on a magnetic separator (IBA, ref. 2-1602-000) in order to magnetize down the MexAB-biotin enriched-proteoliposomes and their potential interacting partner. Within a couple of minutes, the target proteins are specifically pelleted. The corresponding pellets were washed twice with 1 ml of 100 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl before being resuspended directly in a 5X acrylamide gel loading buffer. The proteins were revealed on 10% gels by Laemmli-type SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and stained with Coomassie blue.

Results

Investigation of the Assembly

Streptavidin- or streptactin-coated beads are classically used to purify biotinylated proteins, or proteins containing a strep tag, by affinity chromatography procedures. Here, we take advantage of streptavidin-coated magnetic beads to specifically sediment MexAB proteoliposomes containing biotinylated lipids. As can be seen **Figure 1**, when MexAB proteoliposomes are preincubated with OprM proteoliposomes, OprM is eventually found in the



pellet after sedimentation by the streptavidin-coated magnetic beads, thereby providing a clear evidence of the assembly *in vitro* (see the presence of MexA, MexB, and OprM, lane 6, by comparison with the protein standards lane 2, 3, and 4, respectively). Note that in addition to the presence of OprM itself, one can see complexes of very high molecular mass in the upper part of the gel. These complexes were extracted from the gel, incubated for 1.5 h in water at room temperature and treated under mild heating conditions (60°C for 15 min in SDS PAGE loading dye). This revealed that the high molecular mass complexes were OprM aggregates (data not shown). As a control, we have performed the same experiment in the absence of MexA. MexA is a periplasmic protein that is covalently attached to the membrane via a lipid

anchor. When MexB is reconstituted in the absence of MexA, OprM is not found in the pellet (lane 7), in accordance with the well-documented role of MexA on the formation of the pump. Interestingly, when a soluble version of MexA is added on the latter system, the formation of the complex is not restored (lane 8). Once again, this result is reminiscent with studies that showed that the absence of the lipid anchor severely impairs the ability for the efflux pump to form (Ferrandez et al., 2012). It must be put forward that the soluble version of MexA does not restore the ability to form the complex but is nevertheless able to bind to MexB, as both MexA and MexB are identified on lane 8. Finally, we also decided to study if the complex can form if the experiment is performed in the presence of an inactive version of MexB, mutated

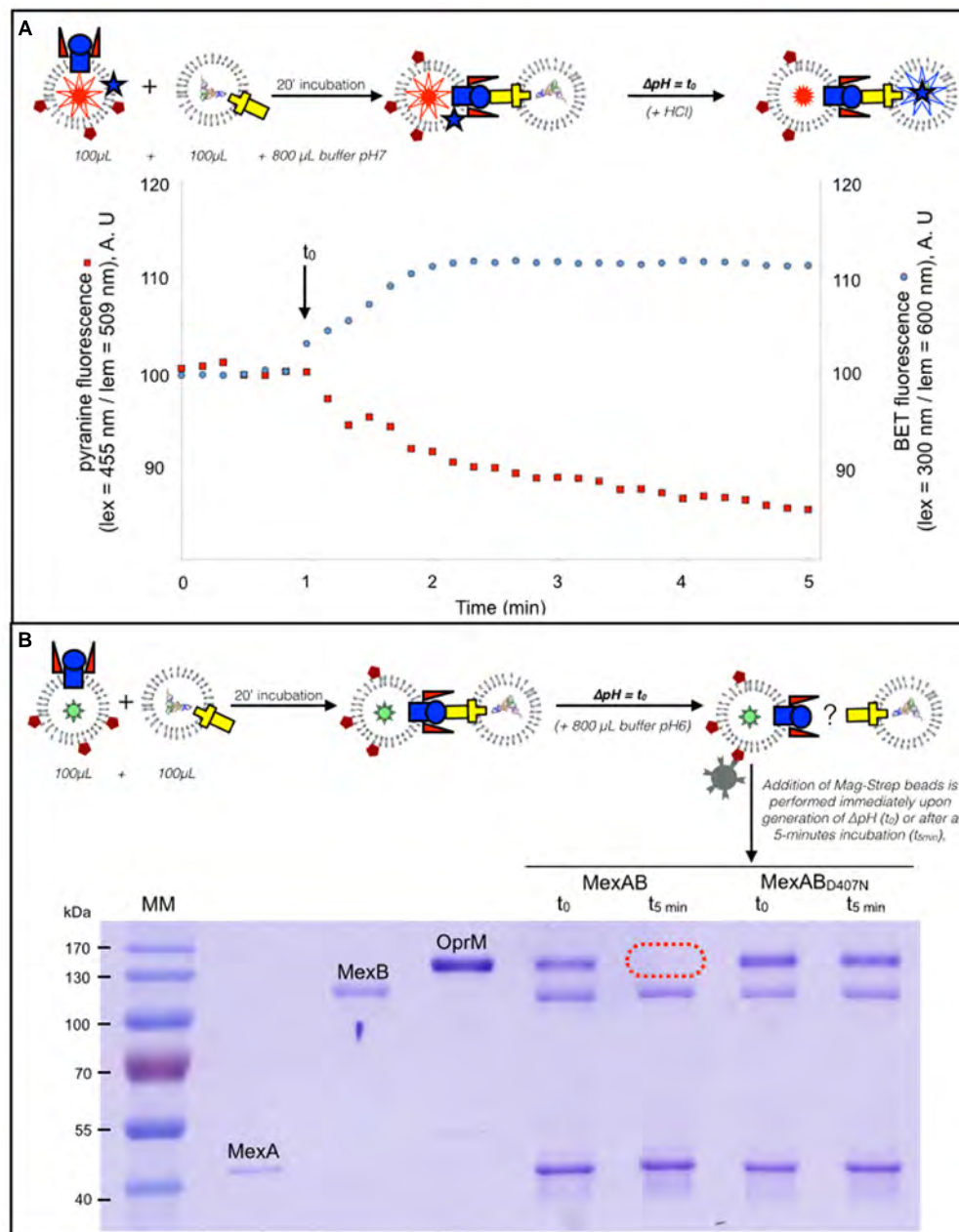


FIGURE 2 | The pull down assay can be adapted in conditions mimicking the transport. (A) Dual wavelength fluorescence

monitoring of transport. Fluorescence measurements were conducted with excitation and emission wavelengths set for the recording of EthB and pyranine fluorescence. OprM proteoliposomes and of MexAB proteoliposomes were mixed and incubated with EthB (5 μ M) and a pH jump, indicated by an arrow, was performed after 20 min incubation. The concomitant fluorescence variations of pyranine (see **A**, red trace) and EthB (see **A**, blue trace) is the proof of actual transport of the substrate from one vesicle to the other.

(B) Mag-Strap-mediated pull-down of proteoliposomes under conditions of a pH gradient. The liposomes used in the experiment shown **(A)** were enriched with biotinylated lipids in order to investigate the kinetics of the tripartite complex assembly in the context of transport. Samples were prepared as described in the Material and Methods section and were incubated for 20 min before being diluted with a buffer containing 20 mM Mes Tris pH6, 100 mM K_2SO_4 , 2 mM $MgSO_4$ in order to generate a pH gradient. Streptavidin-coated magnetic beads were then added either immediately (t_0) or after a 5-min incubation ($t = 5$ min).

in the proton relay pathway (D407N mutant, Guan and Nakaie, 2001; Su et al., 2006; Takatsuka and Nikaido, 2006), and in the presence of the palmitoylated version of MexA. Lane 5 shows

that the complex does form in this condition showing that the mutation, located in the transmembrane part of the protein, does not affect the formation of the pump.

Liposome Pull Down as a Complementary Approach to a Transport Assay

We have previously shown that transport through the whole tripartite pump can be measured thanks to the use proteoliposomes loaded with fluorescent probes that report the activity of MexB and OprM (Verchère et al., 2015). In brief, MexA and MexB are reconstituted in proteoliposomes containing pyranine, while OprM is reconstituted in another kind of proteoliposome in which RNA is encapsulated. Besides, EthB, a substrate of the pump that has DNA-intercalating properties is incubated with the proteins. Pyranine is a pH-dependent probe which fluorescence decreases when pH decreases. EthB fluorescence increases significantly upon intercalation into nucleic acids. Because the pump is energized by the proton motive force (Thanassi et al., 1997; Li et al., 1998; Zgurskaya and Nikaido, 1999), transport can be triggered by generating a change in the pH in the external medium (the pH jump is indicated by an arrow, **Figure 2A**). Efflux is monitored by measuring the simultaneous fluorescence variations of pyranine (see **Figure 2A**, red trace) and EthB (see **Figure 2A**, blue trace): the concomitant fluorescence variations indicate actual transport of the substrate from one vesicle to the other (the increase of EthB fluorescence is ascribed to the intercalation into RNA), mediated by an active transport through the pump (the decrease of pyranine fluorescence is the result of proton counter-transport, hence the acidification of the liposome, by MexB). If the same experiment is now performed in the presence of proteoliposomes where the MexAB_{D407N} inactive mutant is used, both the pyranine and EthB fluorescence signals remain steady (see Verchère et al., 2015). The liposomes used in the experiment shown **Figure 2A** were enriched with biotinylated lipids in order to investigate the kinetics of the tripartite complex assembly in the context of transport, using the pull-down protocol on the very same proteoliposome preparation. To that purpose the proteoliposomes were incubated as described in the previous paragraph except that the buffer used to dilute the liposomes was now more acidic than that in which the proteoliposomes were prepared. As a consequence, a pH gradient is generated across the liposome membrane. As can be seen **Figure 2B**, the tripartite complex is observed upon generation of the pH gradient, as OprM is detected together with MexA and MexB (see “MexAB samples” prepared at t_0). However, after transport has reached steady state (i.e., within a couple of minutes), the complex has seemingly disappeared. Indeed, OprM does no longer interact with MexAB (see the “MexAB samples” prepared at $t = 5$ min). Interestingly, when the same experiment is performed in the presence of the D407N mutant, the complex remains stable (see “MexAB_{D407N} samples” prepared at t_0 and at $t = 5$ min).

Discussion

An Original Technique Allowing to Monitor Transport and Assembly

The formation of the macromolecular complex formed by MexA, MexB, and OprM has been studied for long, by use of various biochemical and biophysical techniques. These studies made it possible to understand key aspects of the mechanism of an efflux

pump but they are rather demanding in term of protein quantity (ITC) and methodology (in SPR, the target protein must be attached on the sensor chip and must remain stable throughout the whole titration experiment). As presented here, our protocol is much more versatile, it is compatible with a medium-large screening of potential inhibitors as it does not require large amounts of protein (typically 10 μ g of protein is necessary for one measurement). Finally, this protocol can be scaled up in 96-wells. In such a case, SDS-PAGE would not be the best identification option but we have adapted the protocol by using OprM proteoliposomes enriched with lipids grafted with a rhodamine function. In such a context, the purple color of the liposomes remains in the supernatant when the complex is not formed, the purple color being lost in the pellet if the complex forms (data not shown). Hence, the assembly could be simply monitored by colorimetry. Our methodology finds its limit in being only qualitative. Indeed, the variability of the efficiency of reconstitution, and the reproducibility of the procedure (washing of the pellets, resuspension in the loading buffer) precludes from any quantitative conclusion. Hence, we can not claim any information on the stoichiometry.

Role of MexA

The results presented **Figure 1** show that MexA is absolutely necessary for the assembly, a result in accordance with previous results. Tikhonova et al. (2011) showed that if an His-tag is located on AcrA or AcrB, a tripartite complex can be purified in measurable quantities from bacterial native membranes. However, if the His-tag is placed on TolC, only traces of the complex are purified. AcrA is thus indispensable for AcrB to co-fractionate with OprM (Tikhonova and Zgurskaya, 2004). The interaction between the different partners has also been investigated using ITC, which allows evaluating the affinity between two components (Touzé et al., 2004). When the interaction between AcrB and TolC is investigated by ITC measurement, no stable interaction is detected. This was interpreted by the fact that AcrA is required for the interaction between AcrA and TolC.

Finally, the efflux pump MtrC-MtrD-MtrE (respectively MFP-RND-OMF) from *Neisseria gonorrhoea* has also been intensely investigated *in vivo* by Janganan et al. (2013). They made use of vancomycin susceptibility to monitor the assembly of the OMF with its RND and MFP partners (Janganan et al., 2013). Gram negative bacteria are not susceptible to vancomycin but become so if the OMF were to open and let the antibiotic diffuse inside the cell. Interestingly if the MFP is expressed together with the OMF, cells become sensitive to vancomycin, meaning that the MFP is required for the OMF to open. Note that, it was shown that a truncated version of the MFP, consisting of the alpha helical hairpin domain only, is not able to open the OMF. Finally the assembly of the whole complex was monitored by SPR (Tikhonova et al., 2011), showing that AcrA-AcrB and AcrA-TolC complexes can be detected. If palmitoylated AcrA and TolC are premixed and then injected on AcrB adsorbed on solid support, the complex does not form, probably because TolC inhibits the interaction between AcrB and AcrA.

The reason for the fact that the soluble MexA does not restore the formation of the complex remains an open question. It could very well be that this construction is intrinsically unable to make

the pump assemble but one can also imagine that this inability to form a complex is purely thermodynamic. Indeed, the lipid anchor may be present for restricting the diffusion of the protein to a two-dimensional space, thereby allowing a more probable interaction with MexB. However, the role of the N-terminal lipid part of AcrA, was investigated in real time by SPR (Tikhonova et al., 2011) and it was shown that when the MFP lacks its lipid anchor, no oligomerization of the MFP is detected. Considering that AcrA binds AcrB as a dimer, it seems probable that the lipid anchor has a genuine effect on the assembly. We have to stress that the observation that the soluble version of MexA is nevertheless able to bind MexB (see **Figure 1**, lane 8) is in contradiction with the fact that Tikhonova et al. showed that the binding of soluble AcrA to AcrB is very weak at pH7.5 and pH6.

Role of pmf on the Assembly

We show that the mutation within the proton relay pathway does not impair the assembly, which indicates that the efflux pump assembly does not require transport activity. Again, this result is in line with the work of Tikhonova and Zgurskaya regarding the assembly of the AcrAB-TolC pump from native bacterial membranes (Tikhonova and Zgurskaya, 2004) where they showed that if the corresponding non-functional mutant of AcrB (AcrB Asp408Ala) is expressed, the complex is still co-purified. Besides, if the proton motive force is disrupted in the cells (using CCCP, valinomycin and/or nigericin) the complex is also co-purified.

Role of pmf on the Disassembly

In a remarkable series of papers, Bavro et al. (2008) previously investigated the energy dependence of the pump assembly, by use of non-functional mutants of MtrD mutated in residues involved in the proton-transducing pathway (Asp405, Asp406, and Lys948). If these mutants are expressed with the MFP and the OMF, cells remain insensitive to vancomycin; indicating that the efflux pump must dissociate under the proton motive force. Although very elegant, this conclusion is indirect and is realized in the context of the bacteria where additional factors could be

suspected. **Figure 2** provides direct and non-ambiguous support for the fact that the proton motive force indeed promotes disassembly of the complex, as evidenced by i) the disappearing of OprM when the wild type pump has reached its steady state and ii) by the maintaining of the assembly when the D407N mutant, defective in proton translocation, is used.

Conclusion

We were able to detect the assembly of an efflux pump after it has been reconstituted into proteoliposomes. We could discriminate between conditions that allow, or favor, the formation of the complex and could also confirm that MexA is mandatory for the assembly to take place. Hence, this is in accordance with several studies obtained in recent years on that matter. Our reconstitution method and the subsequent characterization approach described in the present work allow us to consider further studies of reconstitutions including proteins mutated at various positions, in order to shed light on the actual determinants of transport in a simple system in a bottom-up approach.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MP. Performed the experiments: YN, AV, MP. Wrote the paper: AV, GP, IB, MP.

Acknowledgments

This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV8-0010-01). YN was supported by both Vaincre la Mucoviscidose and the Association Grégory Lemarchal. AV was supported by a grant from Région Ile-de-France (DIM-Malinf 110058). We thank Klaas Martinus Pos for providing us the C43 Δ AcrB strain and Henrietta Venter for the D407N MexB plasmid. We thank Manuela Dezi for her help in the purification of the proteins, and Houssain Benabdelhak, Arnaud Ducruix and Philippe Bénas for their helpful comments on the manuscript. We thank Nathalie Sisattana for technical assistance.

References

- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S.-I., Tsukihara, T., et al. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279, 25939–25942. doi: 10.1074/jbc.C400164200
- Bavro, V. N., Pietras, Z., Furnham, N., Pérez-Cano, L., Fernández-Recio, J., Pei, X. Y., et al. (2008). Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Mol. Cell* 30, 114–121. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.015
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., et al. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509, 512–515. doi: 10.1038/nature13205
- Ferrandez, Y., Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Benas, P., Ulryck, N., et al. (2012). Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis. *Electrophoresis* 33, 1282–1287. doi: 10.1002/elps.201100541
- Guan, L., and Nakae, T. (2001). Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 1734–1739. doi: 10.1128/JB.183.5.1734-1739.2001
- Hinchliffe, P., Symmons, M. F., Hughes, C., and Koronakis, V. (2013). Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 221–242. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155718
- Janganan, T. K., Bavro, V. N., Zhang, L., Borges-Walmsley, M. I., and Walmsley, A. R. (2013). Tripartite efflux pumps: energy is required for dissociation, but not assembly or opening of the outer membrane channel of the pump. *Mol. Microbiol.* 88, 590–602. doi: 10.1111/mmi.12211
- Kim, J.-S., Jeong, H., Song, S., Kim, H.-Y., Lee, K., Hyun, J., et al. (2015). Structure of the tripartite multidrug efflux pump AcrAB-TolC suggests an alternative assembly mode. *Mol. Cells* 38, 180–186. doi: 10.14348/molcells.2015.2277
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li, X. Z., Zhang, L., and Poole, K. (1998). Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* 180, 2987–2991.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I., Totrov, M., and Watkins, W. J. (2006). Waltzing transporters and “the dance macabre” between humans and bacteria. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 56–65. doi: 10.1038/nrd2200
- Mokhonov, V., Mokhonova, E., Yoshihara, E., Masui, R., Sakai, M., Akama, H., et al. (2005). Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization. *Error* 40, 91–100. doi: 10.1016/j.pep.2004.10.002
- Nehme, D., and Poole, K. (2007). Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study

- of pump mutant suppressors. *J. Bacteriol.* 189, 6118–6127. doi: 10.1128/JB.00718-07
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- Pages, J. M., and Amaral, L. (2009). Mechanism of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 826–833. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.12.011
- Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M.-B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., et al. (2010). Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel. *Structure* 18, 507–517. doi: 10.1016/j.str.2010.01.018
- Ponchon, L., Catala, M., Seijo, B., El Khouri, M., Dardel, F., Nonin-Lecomte, S., et al. (2013). Co-expression of RNA-protein complexes in *Escherichia coli* and applications to RNA biology. *Nucleic Acids Res.* 41, e150–e150. doi: 10.1093/nar/gkt576
- Su, C. C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., et al. (2006). Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J. Bacteriol.* 188, 7290–7296. doi: 10.1128/JB.00684-06
- Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7173–7178.
- Takatsuka, Y., and Nikaido, H. (2006). Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *J. Bacteriol.* 188, 7284–7289. doi: 10.1128/JB.00683-06
- Tamura, N., Murakami, S., Oyama, Y., Ishiguro, M., and Yamaguchi, A. (2005). Direct interaction of multidrug efflux transporter acrb and outer membrane channel tolC detected via site-directed disulfide cross-linking[†]. *Biochemistry* 44, 11115–11121. doi: 10.1021/bi050452u
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W., and Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 2512–2518.
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., and Zgurskaya, H. I. (2011). Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem. Biol.* 18, 454–463. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.02.011
- Tikhonova, E. B., and Zgurskaya, H. I. (2004). AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J. Biol. Chem.* 279, 32116–32124. doi: 10.1074/jbc.M402230200
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53, 697–706. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x
- Trépout, S., Taveau, J. C., Benabdelhak, H., Granier, T., Ducruix, A., Frangakis, A. S., et al. (2010). Structure of reconstituted bacterial membrane efflux pump by cryo-electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1953–1960. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.019
- Verchère, A., Dezi, M., Adrien, V., Broutin, I., and Picard, M. (2015). *In vitro* transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Commun.* 6, 6890. doi: 10.1038/ncomms7890
- Weeks, J. W., Celaya-Kolb, T., Pecora, S., and Misra, R. (2010). AcrA suppressor alterations reverse the drug hypersensitivity phenotype of a TolC mutant by inducing TolC aperture opening. *Mol. Microb.* 75, 1468–1483. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07068.x
- Zgurskaya, H. I., and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7190–7195. doi: 10.1073/pnas.96.13.7190

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Enguéné, Verchère, Phan, Broutin and Picard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. Spécificité de la résistance aux aminoglycosides chez *P. aeruginosa*: Caractérisation structurale et fonctionnelle de la pompe MexX – MexY

Les protéines membranaires constituent 50 % des cibles des molécules utilisées dans le domaine thérapeutique. Le nombre de structures de protéines membranaires a considérablement augmenté en une vingtaine d'années, on dénombre actuellement 3 278 structures de protéines membranaires sur les 76 911 structures disponibles dans la PDB, soit 4,26 %. Ces protéines sont cependant difficilement surexprimées par les systèmes d'expression, leur caractérisation structurale reste donc un défi, car elle nécessite la production de quantités de protéine conséquentes.

À ce jour, seules 3 structures de transporteurs RND ont été résolues, les structures d'AcrB, de la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli* (Murakami & al, 2002), de MexB, de la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Sennhauser & al, 2009) et de MtrD, de la pompe MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* (Bolla & al, 2014). La structure du transporteur CusA d'*E. coli* a quant à elle été résolue en complexe avec son partenaire MFP CusB (Su & al, 2014). Le transporteur MexY, de la pompe MexXY-OprM de *P. aeruginosa* présente un intérêt particulier dans la caractérisation structurale et fonctionnelle des transporteurs RND. En effet, cette pompe inductible est impliquée dans la résistance intrinsèque et spécifique de *P. aeruginosa* aux aminoglycosides. Sa surexpression de façon recombinante chez *E. coli* est cependant toxique pour la bactérie et différentes stratégies ont été mises en œuvre afin de permettre sa production.

5.1. Production de MexY à partir du vecteur d'expression pASK-IBA2

5.1.1. Expression

Afin d'exprimer le transporteur RND MexY, la protéine a été clonée à l'aide du vecteur d'expression pASK-IBA2. Le choix de ce vecteur a été orienté par la présence de la séquence signal de la porine OmpA. Cette séquence permet le bon adressage des protéines à la membrane interne. Plusieurs tests d'expression du transporteur MexY ont été réalisés

précédemment, notamment en diminuant la température d'induction, en faisant varier la concentration de l'inducteur, ou encore en utilisant des vecteurs d'expression tels que le vecteur pET28a (Thèse de G. Phan, Université Paris Descartes, 2008), mais la surexpression de la protéine s'est cependant avérée toxique pour la bactérie. Les tentatives de surexpression à l'aide du vecteur pBAD33, ou encore en procédant à une optimisation de codons afin de favoriser l'expression chez *E. coli* s'étant également avérées infructueuses, nous avons émis l'hypothèse d'une absence d'adressage de la protéine à la membrane, qui conduirait à sa dégradation, d'où le défaut d'expression. L'ajout d'une séquence d'adressage nous a donc semblé être une meilleure alternative.

Le transporteur, cloné à l'aide du vecteur pASK-IBA2 est surexprimé de façon recombinante chez *E. coli*, à l'aide de la souche C43 Δ *acrB*, grâce à un promoteur Tet, inductible à l'anhydrotétracycline (AHT). Cette souche, délétée du transporteur RND endogène d'*E. coli* AcrB, permet de prévenir toute contamination, AcrB étant un analogue de MexY possédant une étiquette histidine naturelle au sein de sa séquence protéique. Elle permet également de s'affranchir de la toxicité liée à la production des protéines membranaires. L'expression est induite sur la nuit à 18°C afin d'améliorer le rendement de production.

5.1.2. Purification

La protéine est extraite des membranes internes d'*E. coli*, en présence de DDM et purifiée grâce à deux étapes de chromatographies (affinité et exclusion stérique). Chaque monomère correspond à une masse moléculaire moyenne d'environ 110 kDa. Cependant, la protéine, produite avec un faible rendement de 20 μ g/ litre de culture, est éluée dans le volume mort de la colonne comme le montre le profil d'éluion de la **Figure 112**, obtenu après chromatographie d'exclusion stérique. L'analyse des fractions sur gel SDS-PAGE montre que le pic majoritaire correspond à une protéine éluée sous forme agrégée, les échantillons restant dans les puits.

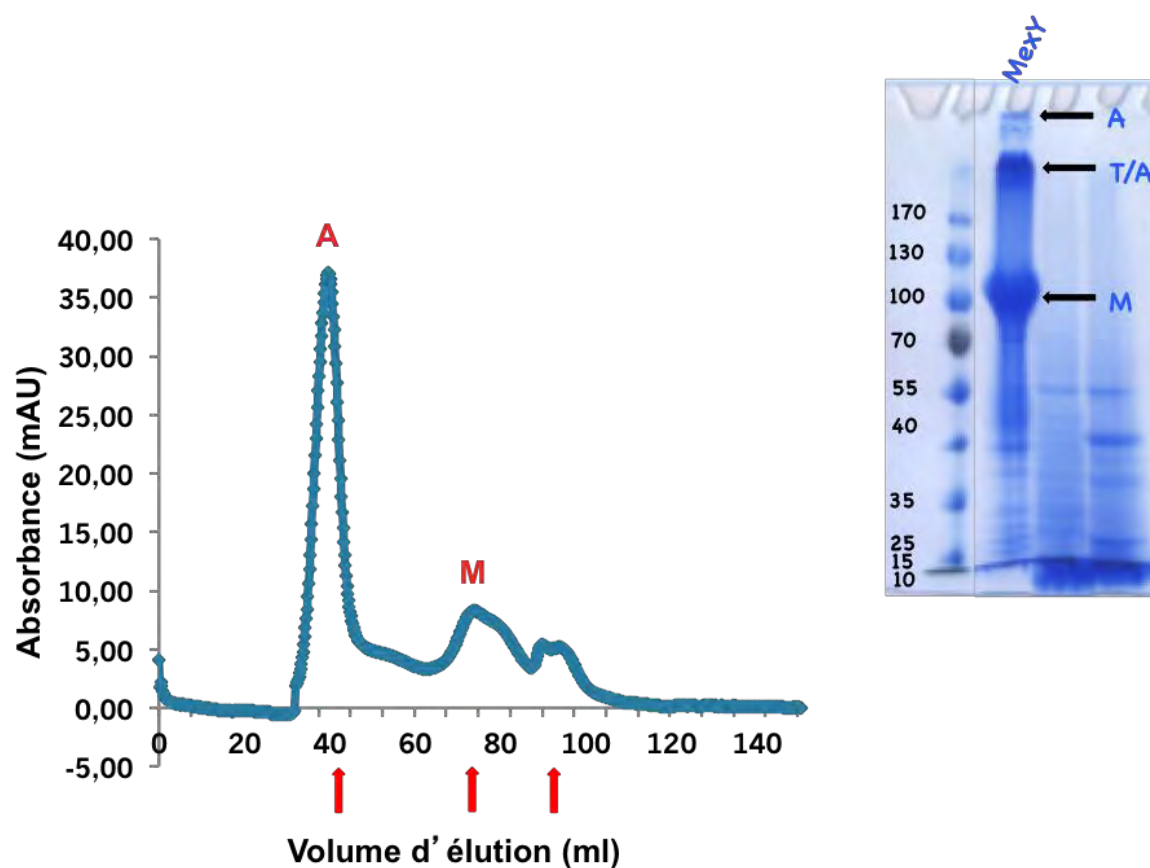


Figure 112 : Profil d'élution de MexY en chromatographie d'exclusion stérique, à partir du vecteur pASK-IBA2. La protéine est majoritairement éluée dans le volume mort de la colonne (pré-calibrée), sous forme agrégée. Une faible proportion de protéines est éluée sous forme soluble et correspond à la forme monomérique. L'analyse de la fraction majoritaire sur gel SDS-PAGE montre une accumulation de protéines agrégées dans le puits et le haut du gel. Les échantillons n'ont pas été chauffés afin de préserver la forme trimérique mais la protéine migre majoritairement sous forme monomérique, les agrégats étant probablement dissociés par le SDS, ce qui indique la faible stabilité du trimère. **A** : agrégats. **M** : monomère. **T** : trimère.

Ce résultat a été confirmé par des images de microscopie électronique réalisées par l'équipe d'Olivier Lambert à l'institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) de Bordeaux, avec qui nous collaborons. Ces images montrent que, contrairement à MexB qui est purifiée sous forme soluble avec des trimères parfaitement isolés, MexY est purifiée sous forme agrégée (**Fig. 113**).

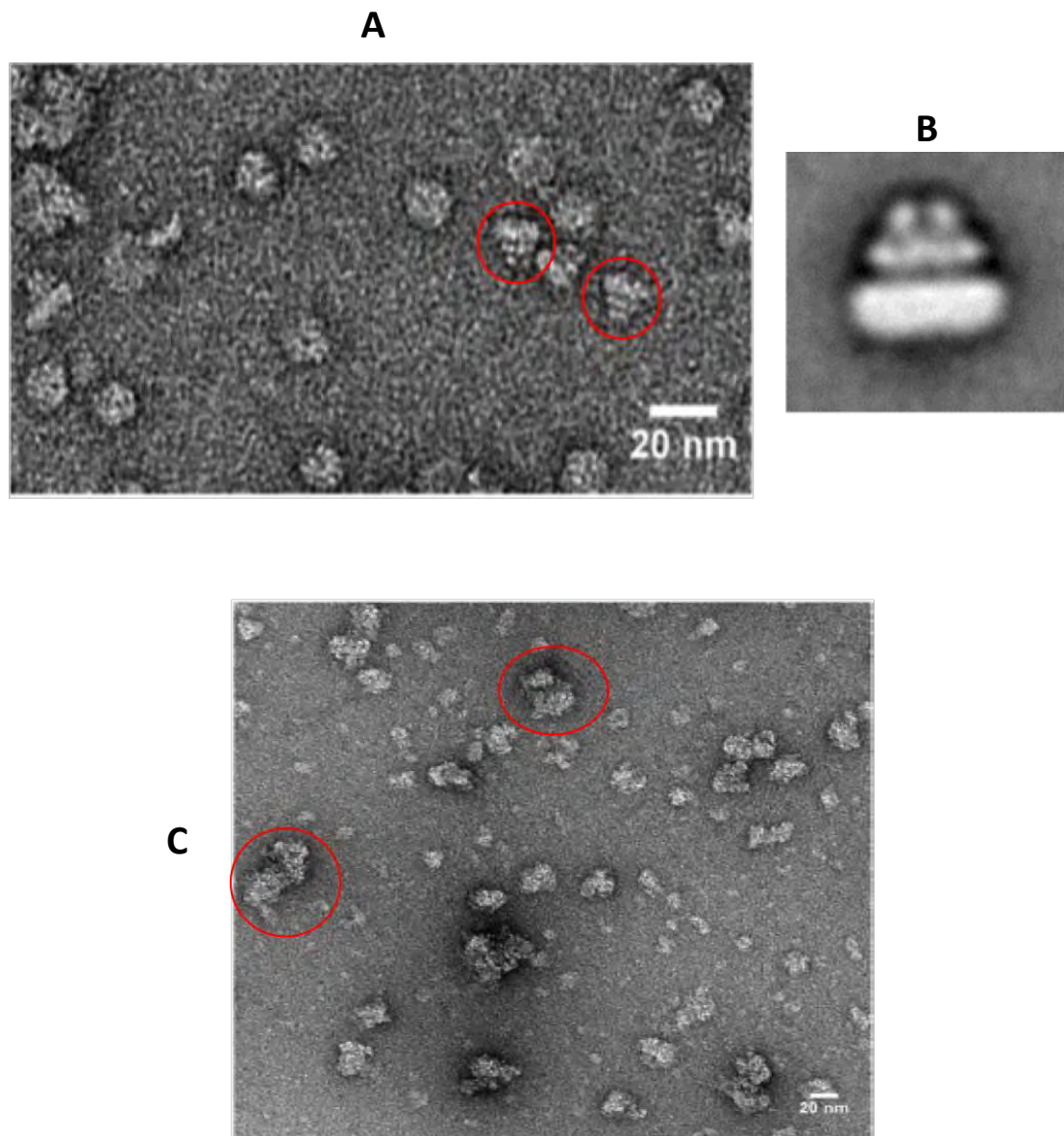


Figure 113 : Images de microscopie électronique de MexB (A et B) et de MexY (C). MexB est purifiée sous forme soluble avec des trimères parfaitement isolés. Une moyennation des images enregistrées est représentée sur la vue (B) alors que MexY, cloné à partir du vecteur pASK-IBA2, correspond à des objets trois fois plus gros (voir échelle), correspondant donc à des agrégats (C).

La faible proportion de protéines purifiées sous forme soluble est cependant éluee à un volume d'élution correspondant à une protéine de 100 – 150 kDa, ce qui correspond, non pas à la forme trimérique mais à un monomère. On retrouve également cette forme monomérique au cours de l'analyse sur gel SDS-PAGE au cours de laquelle les échantillons

ont été déposés sur gel en présence de SDS, sans dénaturation préalable par la chaleur (à 95 °C). Nous avons montré précédemment (§ 1.1.1 et 2.1.1) que ce procédé permet de préserver la forme native (trimérique) des canaux OprN et OprM. Ces résultats montrent que la forme trimérique de MexY est peu stable, tout comme cela avait déjà été observé précédemment pour MexB. Cette instabilité semble être une caractéristique des transporteurs RND, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire à l'étude structurale de ces transporteurs lorsqu'ils ne sont pas insérés dans une membrane.

Il a été montré que des structures d'analogues de MexY (AcrB et MexB) ont été résolues à partir de protéines purifiées en présence d'imidazole additionnée dès l'étape de solubilisation. La purification de MexY à l'aide de l'étiquette Strep II n'implique pas l'usage d'imidazole au cours de la purification. Nous avons donc décidé d'en ajouter aux tampons utilisés dès l'étape de la solubilisation, soit 10 mM d'imidazole pH 8, afin de prévenir la formation d'agrégats. Mais ce traitement n'a pas eu l'effet escompté et la protéine demeure sous forme agrégée.

Nous avons par ailleurs procédé à la purification du transporteur en présence ou en absence de glycérol, en faisant varier le pH, la force ionique, ou encore en présence de différents détergents sans réussir à prévenir la formation ou à dissocier les agrégats. Nous avons émis l'hypothèse d'un mauvais repliement de la protéine et afin de le vérifier, nous avons procédé à des mesures de dichroïsme circulaire afin de déterminer la composition en structures secondaires des échantillons analysés. La prédiction de structure de MexY indique que, tout comme MexB, le transporteur est majoritairement constitué d'hélices α . Le profil obtenu, présenté par la **Figure 114**, correspond au profil d'une protéine majoritairement repliée en hélices α avec des bandes négatives présentant des minima à 208 nm et à 222 nm, minima caractéristiques de ce type de structure secondaire, indiquant ainsi que la protéine est parfaitement structurée, après dilution et centrifugation. Malheureusement, ce traitement ne peut pas être appliqué à grande échelle pour obtenir un lot de protéine pur et homogène pour réaliser des tests de cristallisation.

Les différentes stratégies employées afin de produire le transporteur MexY ayant été infructueuses, nous avons décidé de changer de vecteur.

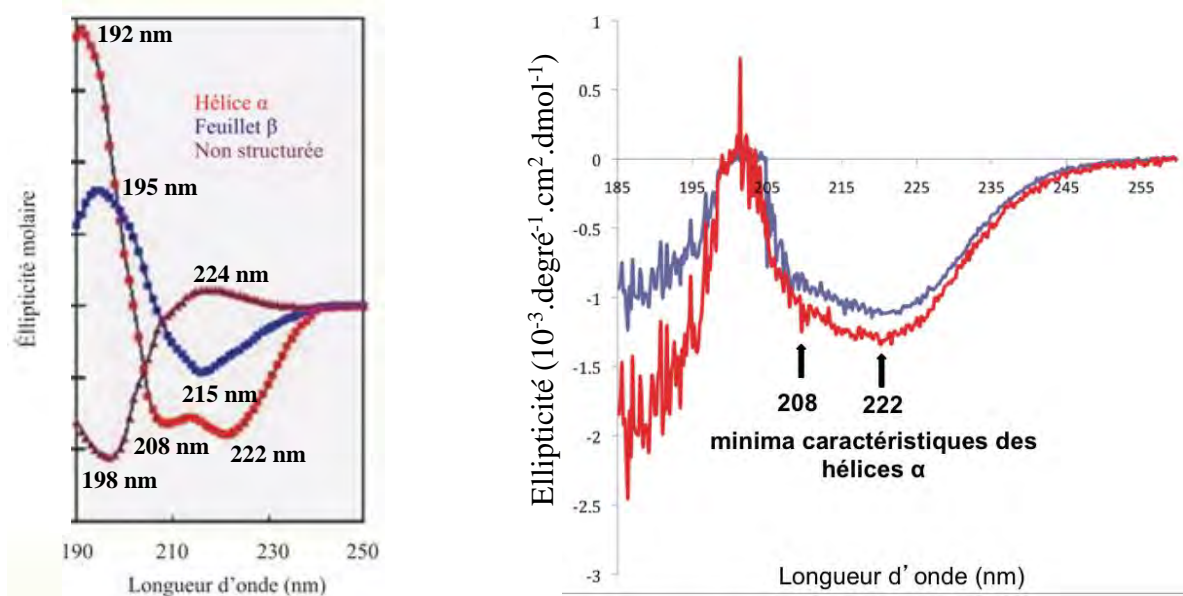


Figure 114 : Spectre de dichroïsme circulaire de MexY, cloné à partir du vecteur pASK-IBA2 réalisé à partir de deux concentrations (0,94 mg/mL en violet et 0,47 mg/mL en rouge). Le spectre de gauche correspond au spectre attendu pour les différentes structures secondaires, le spectre de droite à celui de MexY.

5.2. Production de MexY à partir du vecteur d'expression pET-11a

5.2.1. Expression

Les gènes codant pour le transporteur MexY et son partenaire MFP MexX sont portés par le même opéron chez *P. aeruginosa*. Nous avons donc envisagé l'hypothèse que l'expression et le bon repliement du transporteur seraient dépendants de l'expression et de la présence de MexX. Nous avons donc reconstitué un opéron synthétique, en vue d'une co-expression, à l'aide d'un vecteur bicistronique contenant la séquence de MexY avec MexX en amont de la séquence du transporteur. La séquence intergénique est constituée d'un linker de 15 nucléotides correspondant à la séquence intergénique de l'opéron natif chez *P. aeruginosa*. Nous n'avons cependant pas réussi à exprimer la protéine, ceci étant probablement dû au fait que le promoteur est situé en amont de la séquence de MexX, ce qui ne permet pas une transcription simultanée, mais plutôt une transcription séquentielle des deux cistrons. Il est possible que des structures secondaires se forment au niveau de la

séquence intergénique de l'ARNm, empêchant ainsi l'initiation de la traduction. Nous sommes donc passés à un nouveau vecteur optimisé, le vecteur pET-11a.

Ce vecteur, qui nous a été fourni par l'équipe du Pr Nakae (Université de Kitasato, Japon), est un vecteur bicistronique, également construit sur la base de l'opéron natif de *P. aeruginosa*, qui permet la co-expression de MexY et de MexX. Seul le transporteur MexY porte une étiquette poly-histidine afin de faciliter sa purification ultérieure. À la différence de notre construction, ce vecteur comporte une séquence intergénique constituée de deux linkers séparés par une séquence RBS (ou séquence Shine-Dalgarno, SD), correspondant au site de fixation du ribosome (**Fig. 115**). Le 1^{er} linker, constitué de 17 nucléotides et situé en amont de la séquence SD, permet d'éviter la formation de structures secondaires stables au sein de l'ARNm, car la présence d'une région codante non structurée en 5' est nécessaire pour des taux d'expression élevés (Mokhonova & al, 2005). Le second linker est quant à lui constitué de 9 nucléotides et situé en aval de la séquence SD. L'intérêt de ce linker réside dans le fait qu'il a été montré que le nombre de nucléotides entre la séquence SD et le codon initiateur ATG affectent de façon variable les taux d'expression et que la présence d'une séquence de 7- 10 nucléotides permet d'augmenter les taux d'expression (Mokhonova & al, 2005). La séquence SD native de MexY a quant à elle été remplacée par la séquence SD canonique GAGGA. La protéine, clonée à l'aide du vecteur pET-11a a été surexprimée de façon recombinante chez *E. coli*, comme décrit précédemment (§ 2.1.1), à l'aide de la souche C43 Δ acrB.

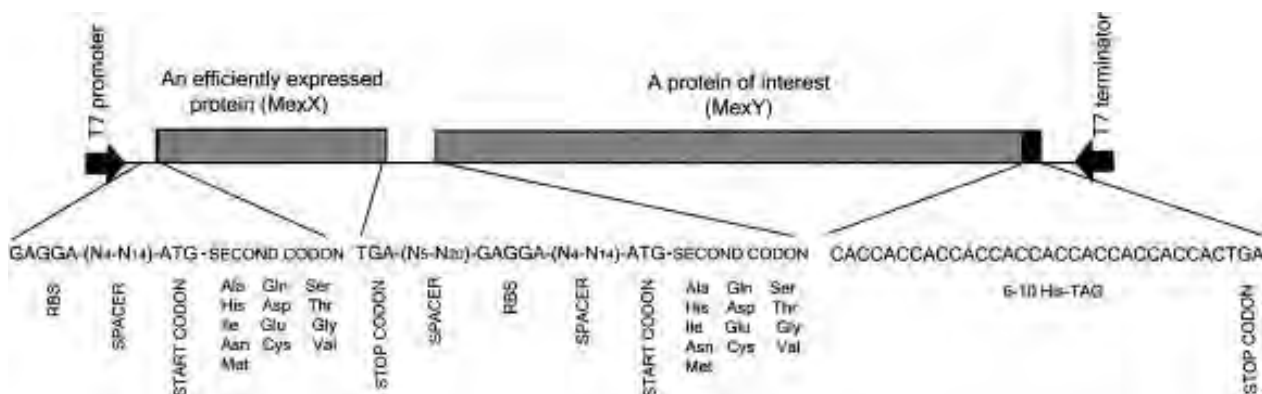


Figure 115 : Représentation de la région codante du vecteur bicistronique pET-11a utilisé pour l'expression de MexY. MexY et son partenaire MFP MexX sont représentés par les rectangles gris, avec MexX cloné en amont de la séquence du transporteur, en aval du promoteur T7. Les séquences correspondant à la séquence canonique Shine-Dalgarno (RBS) ainsi que le second codon (qui contribue à stabiliser la protéine) sont indiqués en-dessous de la carte du vecteur. (Adapté de Mokhonova & al, 2005, Biochemical and Biophysical Research Communications).

5.2.2. Purification et essais de cristallisation

La protéine est purifiée cette fois sous forme soluble, suivant les conditions décrites précédemment (§ 2.1.2), à partir des membranes internes d'*E. coli* et en présence de DDM. Elle est produite avec un rendement dix fois supérieur aux précédentes tentatives, soit 0,25 mg / litre de culture. Le profil d'élution après chromatographie d'exclusion stérique ainsi que l'analyse sur gel montrent que la protéine est majoritairement purifiée sous forme monomérique (Fig. 116).

Au cours des premiers essais de purification, réalisés en présence de sarkosyl, MexY a été co-purifiée avec une protéine qui a été identifiée grâce à une analyse par spectrométrie de masse comme étant MexX (Fig. 116). Par contre, en purifiant le transporteur par la méthode classique en présence de DDM, MexY n'est pas co-purifiée avec son partenaire MFP MexX.

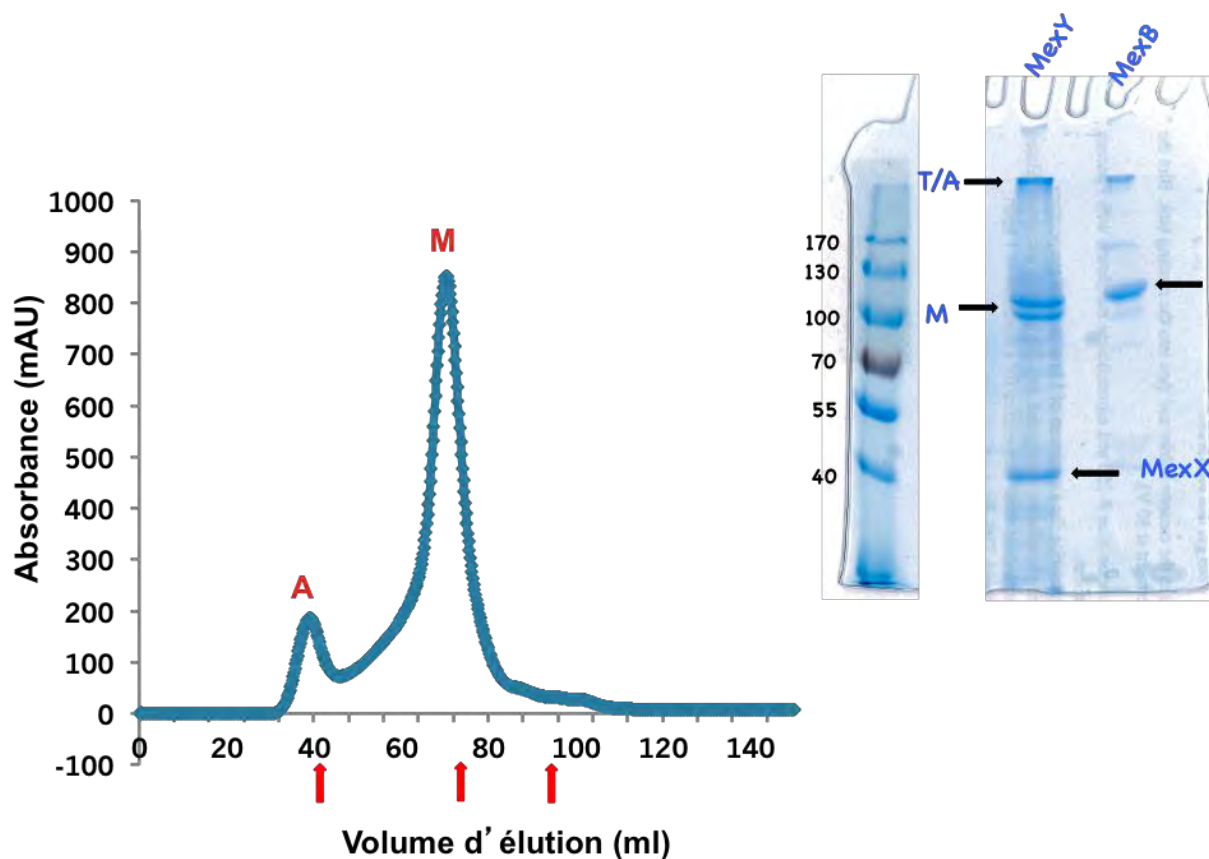


Figure 116 : Profil d'élution de MexY en chromatographie d'exclusion stérique, à partir du vecteur pET-11a. La protéine est majoritairement éluée sous forme soluble, avec un pic majoritaire correspondant au volume d'élution d'un monomère. L'analyse de la fraction majoritaire sur gel SDS-PAGE, sans dénaturation thermique préalable, montre que la protéine migre majoritairement sous forme monomérique, ce qui confirme la faible stabilité du trimère observée précédemment. MexB sert de référence et MexY semble être co-éluée avec MexX. **A** : agrégats. **M** : monomère. **T** : trimère.

Ces résultats semblent indiquer que, même si l'expression de MexX est nécessaire pour l'expression du transporteur sous forme soluble, l'interaction entre les deux protéines n'est, soit pas suffisamment forte pour purifier le complexe bipartite qui est par conséquent dissocié au cours de la purification, soit favorisée ou déstabilisée suivant la nature du détergent. Cette interaction pourra être caractérisée par des méthodes adaptées telles la titration par calorimétrie (ITC) afin de déterminer le degré d'affinité des deux protéines ainsi que l'effet de la nature du détergent sur la stabilité de l'interaction, le transporteur étant dorénavant produit sous forme soluble.

Les fractions éluées ont été concentrées à 6 mg/mL, en vue de démarrer les essais de cristallisation. Les tests de cristallisation ont été réalisés à 18°C à partir de trois kits commerciaux [*MemGold*TM (MD1-39), *MemGold2*TM (MD1-63) et *MemStart*TM/*MemSys*TM HT-96 (MD1-33)] mais aucune piste sérieuse n'a pu être obtenue à ce jour (**Fig. 117**). Il faudra donc certainement continuer à optimiser le protocole de purification de MexY afin de stabiliser le trimère, en modifiant certains paramètres tels que la délipidation au cours de la purification ou encore la nature du détergent.

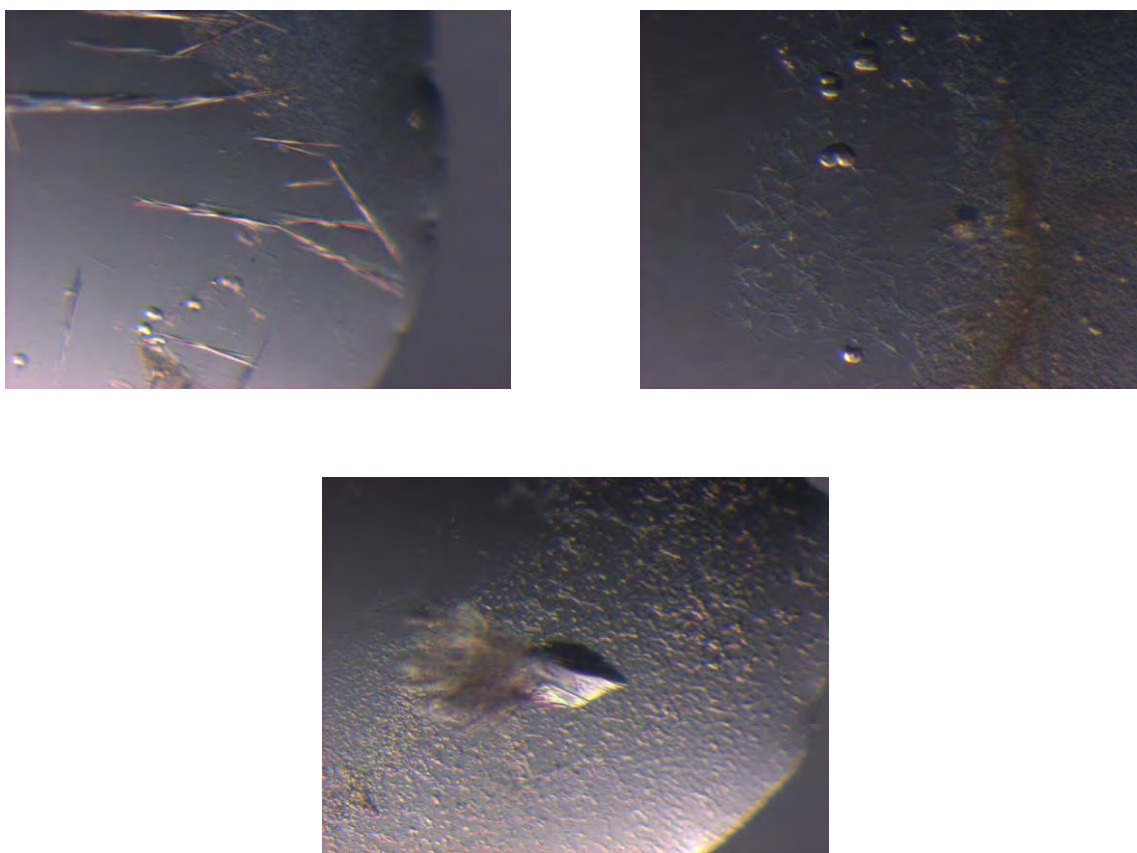


Figure 117 : Pistes de cristallisation de MexY.

6. Modélisation des mutants cliniques de la β -lactamase AmpC

En parallèle à notre étude sur les pompes à efflux de *P. aeruginosa*, nous avons procédé à la modélisation de mutants cliniques de la β -lactamase AmpC, en collaboration avec le laboratoire hospitalo-universitaire de Bactériologie de Besançon, suite à la demande du Pr Patrick Plésiat. Ce laboratoire étant déclaré "Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques", une de ses missions est de prélever et caractériser des souches isolées de patients. Ils ont notamment analysé des crachats de patients atteints de la mucoviscidose collectés dans 21 établissements hospitaliers français.

Ces souches présentent une résistance accrue aux pénicillines et aux céphalosporines liée à une surexpression de la β -lactamase AmpC. *P. aeruginosa*, comme de nombreuses bactéries Gram négatif, possède une β -lactamase endogène inductible, AmpC, qui lui confère une résistance naturelle à de nombreuses molécules dont les aminopénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} et de 2^{nde} génération. La surexpression de cette enzyme permet d'étendre son spectre d'activité à d'autres β -lactamines telles que certaines pénicillines (pipéracilline, ticarcilline), des monobactames (aztréonam) et des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (respectivement ceftazidime et céfépime). Face au développement de nouvelles β -lactamines, de nouvelles β -lactamases à spectre étendu, les ESACs (Extended Spectrum AmpCs) ont émergé, réduisant ainsi l'efficacité de ces antibiotiques mais également celle des combinaisons d'antibiotiques ou d'antibiotiques-inhibiteurs tels que la combinaison pipéracilline-tazobactam ou ceftolozane-tazobactam. La caractérisation des mutants cliniques constitue donc un outil idéal pour le développement de nouvelles β -lactamines ou encore d'inhibiteurs d'AmpC.

L'équipe du Pr Patrick Plésiat a collecté 35 souches cliniques (31 ESACs et 4 non-ESACs) et l'analyse génomique de ces souches a permis d'identifier 17 mutations d'AmpC. La sensibilité des différents variants, renommés PDC-x, a été analysée en présence de différentes β -lactamines, notamment des pénicillines (pipéracilline, ticarcilline), des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (respectivement ceftazidime et céfépime), des combinaisons antibiotiques-inhibiteurs (ceftolozane-tazobactam), des monobactames (aztréonam) et des carbapénèmes (imipénème et méropénème) (voir article, **page 262**).

Les mutants d'AmpC analysés présentent un polymorphisme de séquence avec une redondance de 7 positions (**Fig. 118**). La variation d'acides aminés au niveau de ces différentes positions est également retrouvée chez la souche sauvage de référence PA14 et n'affecte donc pas de façon significative l'activité enzymatique d'AmpC.

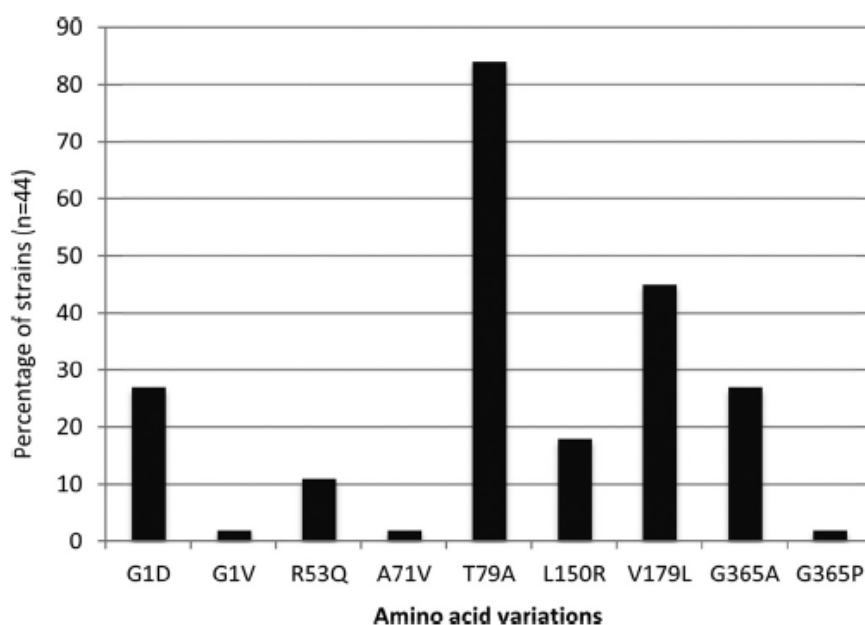


Figure 118 : Polymorphisme de la séquence protéique de la β -lactamase AmpC chez des isolats cliniques et environnementaux de *P. aeruginosa*. (Adapté de Berrazeg & al, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

Les différentes mutations observées affectent de façon variable la sensibilité de *P. aeruginosa* à la ticarcilline, à l'aztréonam, à la céfépime et à la combinaison pipéracilline-tazobactam et 20-23 des mutants analysés présentent une résistance accrue à la ceftazidime et à la combinaison ceftolozane-tazobactam respectivement (2 à 64 fois supérieure à celle de la souche de référence PAO1) (**Tableau 16**).

TABLE 2 Susceptibility profiles of strain 4098 complemented with *bla*_{AmpC} genes

PDC-producing strain	MIC (µg/ml) ^a						Mutation(s) ^b
	TIC	TZP	ATM	CAZ	FEP	CZ/T	
4098(pUCP24)	16 (8)	4 (≤2)	4 (2)	1 (1)	1 (≤0.5)	0.5 (≤0.25)	
4098(pPDC-1) ^c	64 (16)	64 (≤2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
Group 0							
4098(pPDC-3)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	16 (2)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-8)	64 (16)	32 (4)	16 (2)	8 (1)	4 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-24)	64 (8)	64 (≤2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-34)	64 (16)	64 (≤2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-35)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	8 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
Group I							
4098(pPDC-50)	128 (16)	64 (4)	32 (4)	64 (2)	8 (1)	4 (0.5)	V213A
4098(pPDC-74)	256 (128)	8 (4)	128 (32)	>64 (32)	8 (4)	8 (4)	G216R
4098(pPDC-75)	256 (128)	16 (8)	128 (32)	>64 (64)	8 (4)	8 (4)	G216R
4098(pPDC-78)	>512 (512)	32 (16)	>128 (128)	>64 (>64)	16 (16)	16 (16)	G216R, R100H
4098(pPDC-79)	256 (128)	16 (16)	32 (16)	>64 (64)	16 (8)	64 (32)	E221K
4098(pPDC-80)	128 (64)	32 (16)	16 (8)	64 (16)	4 (2)	32 (8)	E221G
4098(pPDC-85)	256 (64)	16 (4)	32 (8)	32 (8)	8 (2)	4 (4)	Y223H
4098(pPDC-86)	256 (128)	16 (16)	32 (32)	>64 (>64)	16 (8)	>64 (64)	E221K
Group II							
4098(pPDC-44)	32 (16)	16 (4)	8 (2)	64 (4)	>64 (4)	2 (0.5)	L294P
4098(pPDC-88)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	64 (2)	>64 (4)	4 (0.5)	Δ(T290-P291)
4098(pPDC-89)	32 (16)	32 (8)	16 (4)	>64 (16)	>64 (32)	8 (2)	Δ(T290-M292)
4098(pPDC-90)	16 (16)	16 (4)	8 (2)	>64 (8)	>64 (16)	4 (1)	Δ(T290-M292)
4098(pPDC-91)	32 (16)	64 (8)	32 (8)	>64 (16)	>64 (64)	16 (2)	Δ(T290-A293)
4098(pPDC-92)	32 (16)	32 (4)	16 (4)	64 (8)	>64 (16)	4 (1)	Δ(L294-Q295)
Group III							
4098(pPDC-73)	128 (16)	64 (≤2)	32 (2)	64 (2)	16 (1)	8 (1)	P154L
4098(pPDC-81)	128 (16)	64 (≤2)	16 (2)	64 (2)	16 (2)	8 (1)	P154L
4098(pPDC-82)	128 (32)	32 (8)	16 (4)	64 (8)	8 (2)	16 (8)	F121L, M175L
Group IV							
4098(pPDC-76)	32 (16)	16 (4)	16 (4)	>64 (16)	16 (2)	4 (1)	N347I
4098(pPDC-87)	64 (16)	32 (8)	32 (4)	>64 (32)	32 (8)	8 (2)	N347I
Groups I + IV							
4098(pPDC-84)	32 (16)	16 (4)	64 (16)	>64 (64)	32 (8)	16 (4)	V213A, N347I

Tableau 16 : Profil de résistance de la souche 4098 de *P. aeruginosa*, délétée de la β-lactamase AmpC et complétée avec des gènes mutés de *bla*_{AmpC}. (Adapté de Berrazeg & al, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

Afin de localiser les différentes mutations observées et d'évaluer leur effet possible sur la résistance, nous avons modélisé les différents variants de *P. aeruginosa* caractérisés par l'équipe du Pr Patrick Plésiat, en mutant les résidus concernés à l'aide du logiciel *MacPymol*. La structure d'AmpC de *P. aeruginosa* (souche de référence PAO1), résolue en complexe avec un substrat au niveau de son site actif (code PDB 2WZZ) a servi de modèle pour l'étude de ces mutants. En fonction de leur localisation structurale et de leur effet sur la sensibilité de *P. aeruginosa* aux différentes β-lactamines testées, les différentes mutations ont été classées en quatre groupes (**Fig. 119**) :

- ✚ Les mutations du groupe I, localisées au niveau de l'extrémité C-terminale de la boucle Ω et de l'hélice α adjacente d'AmpC augmentent la résistance de *P. aeruginosa* à la ticarcilline, à l'aztréonam, à la ceftazidime et à la combinaison ceftolozane-tazobactam. Ces mutations affectent de façon variable la sensibilité à la céfépime et à la combinaison pipéracilline-tazobactam. La boucle Ω , qui correspond à l'un des domaines qui constituent le site actif, est impliquée dans la fixation de la chaîne latérale R1 des β -lactamines. Cette boucle a été décrite comme étant le site présentant le plus grand nombre de mutations impliquées dans l'extension du spectre d'activité des β -lactamases et ces mutations sont conservées chez de nombreuses bactéries Gram négatif telles qu'*E. coli*. L'analyse structurale n'a cependant pas permis d'expliquer l'effet des mutations sur la résistance observée en présence des β -lactamines testées.
- ✚ Les mutations du groupe II, localisées au niveau du domaine R2 d'AmpC (principalement au niveau de l'hélice H10 et de l'extrémité N-terminale de la boucle R2), correspondent à des délétions. Ces mutations affectent l'activité catalytique d'AmpC, notamment l'hydrolyse des céphalosporines de 3^{ème} et de 4^{ème} génération. Elles contribuent à l'augmentation de la résistance de *P. aeruginosa* à la ceftazidime, à la céfépime et à la combinaison ceftolozane-tazobactam. Ces mutations contribuent à augmenter le volume du site actif, permettant ainsi l'hydrolyse de β -lactamines possédant une chaîne latérale R2 volumineuse.
- ✚ Les mutations du groupe III, localisées au niveau de la boucle conservée YSN, augmentent la résistance de *P. aeruginosa* à la ceftazidime et à la combinaison ceftolozane-tazobactam. Ces mutations empêchent l'interaction par stacking des résidus aromatiques de l'extrémité de l'hélice H5 et de la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$, provoquant ainsi un mouvement de la boucle qui permet d'élargir la poche de fixation du substrat, contribuant ainsi à modifier la spécificité de substrats d'AmpC.
- ✚ Les mutations du groupe IV correspondent aux mutations du résidu catalytique conservé Asn347. Ce résidu contribue à la reconnaissance et à la fixation du substrat au niveau du site actif. Sa mutation pourrait donc affecter le positionnement du substrat au cours de l'hydrolyse.

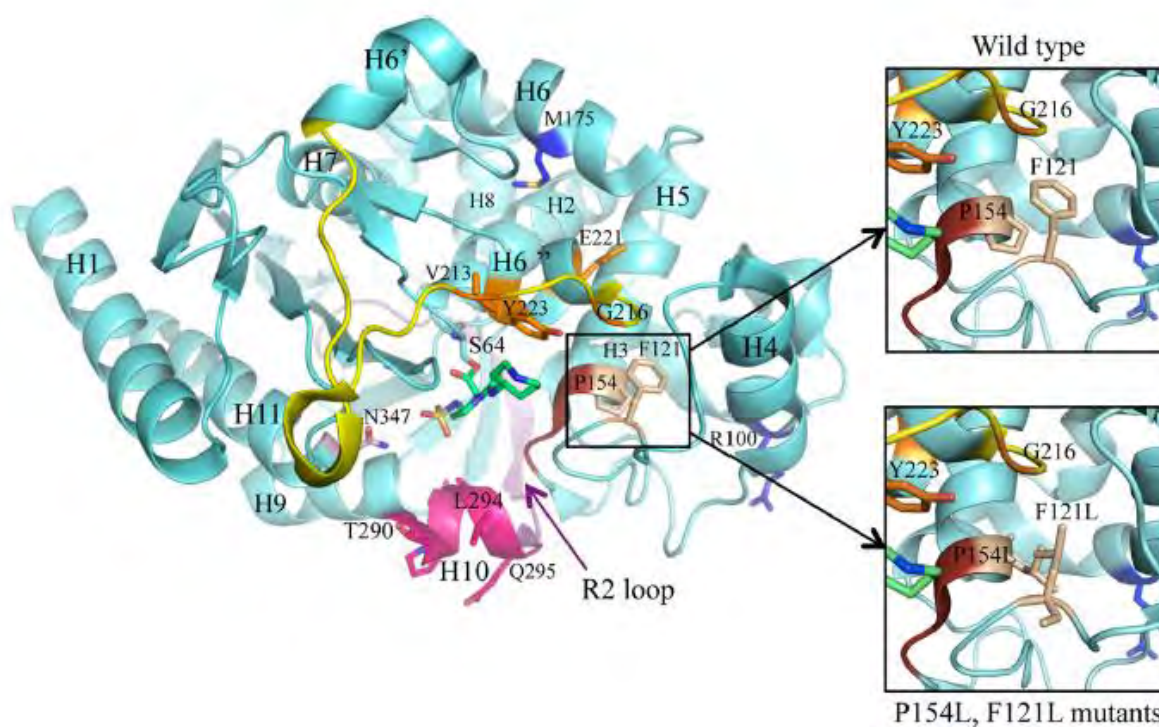


Figure 119 : Représentation de la structure de la β -lactamase AmpC de *P. aeruginosa* (en bleu) en complexe avec un inhibiteur (en vert). Les régions qui constituent le site actif sont représentées en jaune pour la boucle oméga, en rose pour l'hélice H10, en violet pour la boucle R2 et en marron foncé pour la boucle YSN. Les résidus impliqués dans la résistance liée aux ESACs sont indiqués en fonction des groupes auxquels ils appartiennent : le groupe I en orange, le groupe II en rose, le groupe III en beige et le groupe IV en rose pâle. (Adapté de Berrazeg & al, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy).

L'ensemble des résultats montre que *P. aeruginosa* est capable de développer de nouveaux systèmes de résistance et de s'adapter à des β -lactamines efficaces utilisées dans les traitements anti-*Pseudomonas*, notamment des céphalosporines de 3^{ème} et de 4^{ème} génération. Cette résistance implique des mutations de sa céphalosporinase endogène AmpC et ces mutations émergent localement chez une variété de clones cliniques sans implication de l'hypermutabilité des souches.

Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins

M. Berrazeg,^a K. Jeannot,^a Véronique Yvette Ntsogo Enguéné,^b I. Broutin,^b S. Loeffert,^a D. Fournier,^a P. Plésiat^a

French National Reference Center for Antibiotic Resistance, University Hospital of Besançon, Besançon, France^a; Laboratoire de Cristallographie and RMN Biologiques, CNRS UMR8015 and Université Paris Descartes, Paris, France^b

Mutation-dependent overproduction of intrinsic β -lactamase AmpC is considered the main cause of resistance of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* to antipseudomonal penicillins and cephalosporins. Analysis of 31 AmpC-overproducing clinical isolates exhibiting a greater resistance to ceftazidime than to piperacillin-tazobactam revealed the presence of 17 mutations in the β -lactamase, combined with various polymorphic amino acid substitutions. When overexpressed in AmpC-deficient *P. aeruginosa* 4098, the genes coding for 20/23 of these AmpC variants were found to confer a higher (2-fold to >64-fold) resistance to ceftazidime and ceftolozane-tazobactam than did the gene from reference strain PAO1. The mutations had variable effects on the MICs of ticarcillin, piperacillin-tazobactam, aztreonam, and cefepime. Depending on their location in the AmpC structure and their impact on β -lactam MICs, they could be assigned to 4 distinct groups. Most of the mutations affecting the omega loop, the R2 domain, and the C-terminal end of the protein were shared with extended-spectrum AmpCs (ESACs) from other Gram-negative species. Interestingly, two new mutations (F121L and P154L) were predicted to enlarge the substrate binding pocket by disrupting the stacking between residues F121 and P154. We also found that the reported ESACs emerged locally in a variety of clones, some of which are epidemic and did not require hypermutability. Taken together, our results show that *P. aeruginosa* is able to adapt to efficacious β -lactams, including the newer cephalosporin ceftolozane, through a variety of mutations affecting its intrinsic β -lactamase, AmpC. Data suggest that the rates of ESAC-producing mutants are $\geq 1.5\%$ in the clinical setting.

Pseudomonas aeruginosa is a well-known cause of acute and chronic infections in fragile patients. One of the most remarkable traits of this opportunistic pathogen is its ability to evolve and become resistant to many antibiotics through a variety of mutational and transferable mechanisms (reviewed in reference 1). Some mechanisms tend to prevent the interaction of drugs with their cognate cellular targets, while others result in drug inactivation (1). Like several other Gram-negative species, *P. aeruginosa* harbors a chromosomal drug-inducible gene, *bla*_{AmpC}, encoding a wide-spectrum class C β -lactamase (2). This enzyme contributes to the natural resistance of the microorganism toward labile and inducing molecules, such as aminopenicillins, first- and second-generation cephalosporins (3). More importantly, when overproduced as a result of mutations altering the peptidoglycan recycling process, AmpC becomes a major cause of resistance to widely used antipseudomonal penicillins (ticarcillin and piperacillin), monobactams (aztreonam), and third-generation (ceftazidime) and fourth-generation (cefepime) cephalosporins (4–7). The so-called “derepressed mutants” are common in the clinical setting and account for a large proportion of strains resistant to ceftazidime and cefepime in various studies (8–11). This worrisome situation has called for the development of new β -lactams such as ceftolozane and novel AmpC inhibitors such as avibactam that show promising activities against this type of mutants (12, 13).

Class C β -lactamase variants showing unusual substrate specificities (named ESACs for extended-spectrum AmpCs) have been characterized in several Gram-negative pathogens (14). However, because of the high sequence polymorphism of AmpC in *P. aeruginosa* (affecting more than 22% of its amino acid residues), the occurrence of ESACs in this species has remained largely unexplored (15). This study demonstrates that such variants have potential therapeutic implications as they are responsible for a

higher resistance to ceftazidime and ceftolozane-tazobactam than to piperacillin-tazobactam in clinical strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. Thirty-five (31 ESAC and 4 non-ESAC) strains of *P. aeruginosa* isolated between 2009 and 2014 in 21 French hospitals and health care facilities were used in this study as sources of different AmpC variants, named PDCs for *Pseudomonas*-derived cephalosporinases. These strains were referred to the French National Reference Center (NRC) for Antibiotic Resistance (University Hospital, Besançon, France) for analysis of their resistance mechanisms to β -lactams and were found to produce AmpCs differing from that of reference strain PAO1 (16) by at least one amino acid residue. Strain PA14 (17) was used as the source of PDC-34. The resistance phenotypes conferred by the cloned *bla*_{AmpC} genes were assessed in strain 4098, an AmpC-deficient mutant from PAO1 (18), while the impact of enzymes PDC-1 and PDC-3 on carbapenem susceptibility was investigated more specifically in mutant PAO1 Δ *oprD* (19), which lacks the carbapenem-specific uptake porin OprD. The PBP4-deficient mutant PAO1 Δ *dacB* (6), which constitutively overproduces PDC-1, was used as a control in MIC exper-

Received 7 April 2015 Returned for modification 10 May 2015

Accepted 19 July 2015

Accepted manuscript posted online 27 July 2015

Citation Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, Plésiat P. 2015. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6248–6255. doi:10.1128/AAC.00825-15.

Address correspondence to P. Plésiat, patrick.plesiat@univ-fcomte.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00825-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AAC.00825-15

iments. In addition, 44 nonredundant, antibiotic-susceptible strains of *P. aeruginosa*, including 39 isolates from the University Hospital of Besançon and 5 isolates from surface waters of eastern France, were selected from the laboratory collection to investigate the sequence polymorphism of AmpC in wild-type *P. aeruginosa*. Molecular biology experiments were performed with *Escherichia coli* DH5 α (Life Technologies) as the recipient strain. The *bla*_{AmpC} genes were cloned into the broad-host-range plasmid vector pUCP24, kindly supplied by Herbert Schweizer (Colorado University) (20). Bacteria were cultivated at 35 \pm 1°C on Mueller-Hinton (MH) agar (Bio-Rad) supplemented with gentamicin (5 μ g/ml for *E. coli* and 50 μ g/ml for *P. aeruginosa*) to maintain pUCP24 and its derivatives where needed.

Drug susceptibility testing. MICs (shown as \leq susceptible [S] breakpoint/ \geq resistant [R] breakpoint) of ticarcillin (16/128 μ g/ml), piperacillin-tazobactam (16-4/128-4 μ g/ml), ceftazidime (8/32 μ g/ml), cefepime (8/32 μ g/ml), ceftolozane-tazobactam (breakpoints pending), aztreonam (8/32 μ g/ml), imipenem (2/8 μ g/ml), and meropenem (2/8 μ g/ml) were determined with and without 250 or 1,000 μ g/ml cloxacillin using customized Sensititre plates, according to the instructions of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). All plates were incubated at 35 \pm 1°C for 18 \pm 2 h with inocula of 10⁵ CFU/ml. The strains were considered “susceptible” (S), “intermediate” (I), or “resistant” (R) to the tested drugs in reference to the Clinical and Laboratory Standards Laboratory (CLSI) breakpoints (21).

Molecular typing of the strains. The epidemiological relatedness of the clinical *P. aeruginosa* strains was studied by multilocus sequence typing (MLST) based on the allelic variations of 7 housekeeping genes, namely, *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE* (22). The isolates were assigned a sequence type (ST) number according to the allelic profiles available in the MLST Database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>).

Analysis and cloning of *bla*_{AmpC} genes. Genomic DNA was extracted and purified from the clinical strains by using QIAamp DNA minikit (Qiagen). For sequencing purposes, the *bla*_{AmpC} genes were amplified by PCR with primers SeqAmpC-PA14-Fw1 (5'-TGGGGTTCGAACCAATCTCTA-3'), SeqAmpC-PA14-Fw2 (5'-CAGATCCGCGACTACTACCG-3'), SeqAmpC-PA14-Rv1 (5'-ACGTCGAGGTGGGTCTGTT-3'), and SeqAmpC-PA14 Rv2 (5'-CTCATGGCACCATCATAGCC-3'). The amplicons were sequenced using the BigDye Terminator chemistry on an automated ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems), and the resulting data were edited using BioEdit 7.1.9 software (Tom Hall, North Carolina State University, Raleigh, NC). For cloning purposes, the *bla*_{AmpC} genes were PCR amplified and cloned into plasmid vector pUCP24, as already described (23). After a DNA sequencing step ensuring that no mutations had been introduced during PCR amplification, the resulting pPDC plasmids were transferred by electroporation (Bio-Rad MicroPulser) into *P. aeruginosa* 4098. Transformants were selected on MH agar supplemented with gentamicin, the selection marker for pUCP24, and characterized as to their resistance levels to selected β -lactams. Plasmids pPDC-1 and pPDC-3 were further electroporated into porin OprD-deficient mutant 4098 Δ *oprD*.

RT-qPCR experiments. For the reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) experiments, the bacterial strains were cultivated aerobically to the mid-log phase in drug-free Mueller-Hinton broth. Their total RNA content was extracted and reverse transcribed as described by Dumas et al. (24). The expression of gene *bla*_{AmpC} and housekeeping gene *uvrD* was then assessed in a Rotor Gene RG6000 instrument (Qiagen, Courtabouef, France) by using the intercalating dye Rotor-Gene SYBR green (Qiagen) and primer pairs AmpC1/AmpC2 and UvrD1/UvrD2, respectively (24, 25). Sequence alignment analysis confirmed the absence of base mismatch between the primers and the target genes, ensuring efficient PCR amplification. The mRNA levels of *bla*_{AmpC} were normalized with those of *uvrD* for each strain and expressed as a ratio (fold change) to that of wild-type strain PAO1, used as the reference. Mean gene expression values were calculated from two independent bacterial cultures, each assayed in duplicate.

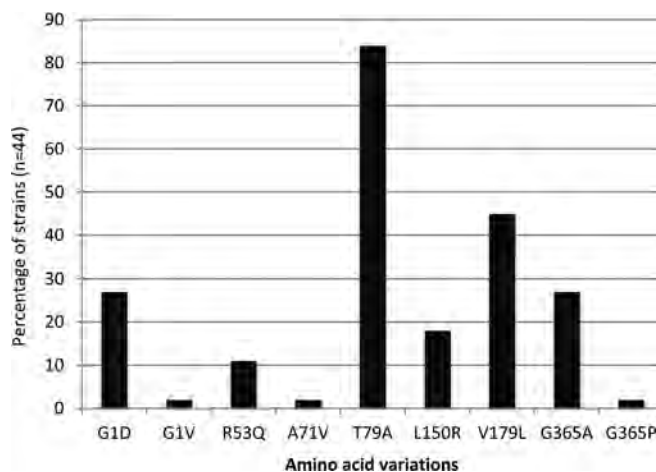


FIG 1 Amino acid sequence polymorphism of β -lactamase AmpC among nonredundant clinical ($n = 39$) and environmental ($n = 5$) antibiotic-susceptible strains of *P. aeruginosa*.

Structure-function analysis of AmpCs. The AmpC sequence, corresponding to the genomic locations 4594029 to 4595222 on strain PAO1, was extracted from the *Pseudomonas* Genome Database (<http://www.pseudomonas.com/>). A BLAST search was performed, choosing the Protein Data Bank (PDB) as the search database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), resulting in 43 PDB structures presenting an E value lower than 10⁻¹⁰⁰ and 11 with an E value between 10⁻¹¹ and 10⁻⁴. Among them, those presenting a β -lactamase in complex with a molecule in its active site were selected and superposed on the structure of PAO1 AmpC (PDB code 2WZZ). In order to evaluate the possible effect of the different observed mutations, all of the corresponding positions were mutated using PyMOL on the 2WZZ structure. All the structural figures were drawn using Pymol software (PyMOL Molecular Graphics system [<http://pymol.sourceforge.net/>]).

Accession numbers. The sequences of *bla*_{AmpC} genes corresponding to the following PDCs have been deposited in GenBank under the accession numbers shown in parentheses: PDC-73 (KR057742), PDC-74 (KR057743), PDC-75 (KR057744), PDC-76 (KR057745), PDC-77 (KR057746), PDC-78 (KR057747), PDC-79 (KR057748), PDC-80 (KR057749), PDC-81 (KR057750), PDC-82 (KR057751), PDC-83 (KR057752), PDC-84 (KR057753), PDC-85 (KR057754), PDC-86 (KR057755), PDC-87 (KR057756), PDC-88 (KR057757), PDC-89 (KR057758), PDC-90 (KR057759), PDC-91 (KR057760), PDC-92 (KR057761), and PDC-93 (KR057762).

RESULTS AND DISCUSSION

Sequence polymorphism of *P. aeruginosa* AmpC. Amino acid substitutions G1D/V, A29T, R53Q, A71V, T79A, K82E, Q129R, L150R, V179L, V330I, and G365A have been reported to occur in AmpC enzymes produced by β -lactam-resistant strains of *P. aeruginosa*, compared with the mature (i.e., after cleavage of the 26-amino-acid-long signal peptide) protein from reference strain PAO1 (26, 27). In this study, analysis of the coding sequence of *bla*_{AmpC} genes from 44 antibiotic-susceptible strains isolated at the hospital ($n = 39$) or in natural environments ($n = 5$) showed the same amino acid variations described above at positions 1, 53, 71, 79, 150, 179, and 365 (Fig. 1). Given that most of these substitutions are present in the enzyme of wild-type reference strain PA14 (Table 1), collectively, these results support the notion that such a polymorphism has little or no impact on the enzymatic activity of AmpC (i.e., as it is found in both bacteria susceptible to and bac-

TABLE 1 Amino acid variations in the sequences of PDC enzymes

Strain(s)	PDC	Residue at amino acid position shown ^a																											
		1	19	29	71	79	100	121	129	150	154	175	179	213	216	221	223	290	291	292	293	294	295	330	347	365			
Wild-type AmpC producers																													
PAO1 ^b	PDC-1	G	V	A	A	T	R	F	Q	L	P	M	V	V	G	E	Y	T	P	M	A	L	Q	V	N	G			
14.2028	PDC-3					A																							
13.1642	PDC-8					A				R																			
13.1781	PDC-24					A																							
PA14 ^b	PDC-34	D	T			A			R				L													A			
11.773	PDC-35	D		V	A								L													A			
ESAC producers																													
12.1227 and 12.1255	PDC-44					A																P							
10.257	PDC-50					A							A																
12.1285	PDC-73					A				L																			
12.1111 and 13.1716	PDC-74					A								R															
12.1129 and 13.1727	PDC-75					A								R										I					
13.1415	PDC-76					A																				I			
13.1404, 13.1696, and 13.1760	PDC-77													R															
11.571	PDC-78						H							R															
11.516	PDC-79																K												
13.1737	PDC-80																G												
13.1514	PDC-81					A				L																A			
13.1770	PDC-82					A		L				L														A			
4836	PDC-83		A			A									A											A			
13.1482	PDC-84		A			A									A										I	A			
12.961	PDC-85					A												H								A			
13.1755 and 14.1999	PDC-86	D				A						L					K							I		A			
11.698 and 13.1775	PDC-87	D				A						L												I	I	A			
13.1601	PDC-88	D				A						L												I		A			
09.236	PDC-89	D				A						L												I		A			
13.1562	PDC-90	D				A						L												I		A			
11.813	PDC-91	D				A						L												I		A			
12.1121 and 13.1389	PDC-92	D				A						L												I		A			
14.2036	PDC-93	D				A						L												P		A			

^a The numbering of the amino acids refers to the mature protein from strain PAO1, after cleavage of the 26 N-terminal amino acid residues of the signal peptide. Variations highlighted in boldface are considered common polymorphisms. The role of V19A has not been investigated specifically in this study.

^b Reference strain of *P. aeruginosa* (<http://v2.pseudomonas.com>).

teria resistant to β -lactams). Consistent with this, the interchangeable amino acids appeared to be distant from the active site, with residues at positions 1, 79, 129, and 365 being located on the opposite surface and those at positions 29 and 179 being part of secondary structure elements close to the surface that can easily adapt the local mutations. Referring to the initial classification of AmpC variants (from PDC-1 to PDC-10 for *Pseudomonas*-derived cephalosporinases 1 to 10) established by Rodriguez-Martinez et al. (26), variant PDC-1 (identical to that of PAO1 by definition) was found to be produced by 7 of the 44 wild-type strains analyzed, PDC-3 by 6 strains, PDC-5 by 4 strains, PDC-7 by 2 strains, and PDC-8 by 8 strains, while the 17 remaining isolates harbored various allelic combinations not reported in this classification scheme. The K82E and V330I changes reported previously were not identified in the present collection (26).

Clinical strains with unusual resistance profiles. From 2009 to 2014, 2,040 clinical isolates of *P. aeruginosa* were referred to the French National Reference Center for Antibiotic Resistance to characterize their resistance mechanisms to antibiotics, mainly β -lactams. Among these strains, 506 (24.8%) and 471 (23.1%)

were found to produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases, respectively, by phenotypic and molecular biology techniques (unpublished data). In addition, 810 (37.7%) strains recovering their susceptibility to penicillins and cephalosporins when tested by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar supplemented with class C inhibitor cloxacillin (2) at 1,000 $\mu\text{g/ml}$ were considered AmpC-overproducing mutants. Unlike these typical AmpC overproducers (as illustrated in Table S1 in the supplemental material), 31 (1.5%) isolates that showed rather uncommon resistance profiles characterized by a higher resistance to ceftazidime than to piperacillin-tazobactam were investigated more extensively. None of them appeared to produce transferable β -lactamases (data not shown).

According to the current CLSI breakpoints, 12.9% ($n = 4$) and 87.1% ($n = 27$) of these strains were intermediate and resistant to ceftazidime, respectively, with MICs ranging from 16 to >512 $\mu\text{g/ml}$. Using the same breakpoints (8 $\mu\text{g/ml} \leq S$ and $R \geq 32$ $\mu\text{g/ml}$), ceftolozane combined with 4 $\mu\text{g/ml}$ tazobactam performed better, with 58.1% ($n = 18$), 12.9% ($n = 4$), and 29% ($n = 9$) of strains being susceptible, intermediate, and resistant to the

drug, respectively (MICs from 0.5 to >64 µg/ml). Categorization of bacteria as S, I, and R for the other β-lactams tested was as follows: ticarcillin, 6.4%, 9.7%, and 83.9%; piperacillin plus 4 µg/ml tazobactam, 48.4%, 35.5%, and 16.1%; aztreonam, 16.1%, 12.9%, and 71%; cefepime, 12.9%, 25.8%, and 61.3%; imipenem, 22.6%, 9.7%, and 67.7%; and meropenem, 19.4%, 29%, and 51.6%. In contrast to *in vitro* mutant PAO1Δ*dacB*, only 4 of the 31 strains recovered their susceptibility to ceftazidime (MIC, ≤8 µg/ml) in the presence of cloxacillin (see Table S1 in the supplemental material).

Identification of new AmpC variants. Sequencing of gene *bla*_{AmpC} revealed the occurrence of 23 different AmpC variants (dubbed PDCs in the current nomenclature) among the selected bacteria, including 21 new variants with respect to the 72 PDCs listed previously (15, 26) (Table 1). Seventeen so far uncharacterized mutations at 15 amino acid positions were combined with 0 to 5 variations presumed to be common polymorphisms (described above): R100H, F121L, P154L, M175L, V213A, G216R, E221K/G, Y223H, ΔT290-ΔP291, ΔT290-ΔM292, ΔT290-ΔA293, ΔL294-ΔQ295, L294P, and N347I (Table 1). Of note, AmpC variant PDC-77 was produced by 3 strains, and PDC-44, PDC-74, PDC-75, PDC-86, PDC-87, and PDC-92 were each expressed by 2 isolates, while the 16 remaining variants were found in single isolates. RT-qPCR experiments showed that all of the selected strains constitutively overexpressed the *bla*_{AmpC} gene, with relative values ranging from 4.4- to 2,895-fold (median 686-fold) compared with wild-type strain PAO1. As noted previously (27, 28), no correlation could be found between these expression levels and β-lactam MICs, suggesting a posttranscriptional regulation of AmpC production or the influence of undetermined resistance mechanisms in individual strains. Interestingly, the *bla*_{AmpC} transcripts were quantitatively lower (median, 162-fold) in slow-growing bacteria isolated from cystic fibrosis (CF) patients than in bacteria from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients (median 1,031-fold) or non-CF, non-COPD patients (median, 906-fold).

Impact of PDCs on β-lactam MICs. The *bla*_{AmpC} genes of 20 PDC enzymes harboring the various mutations were amplified by PCR, cloned into the broad-host-range vector pUCP24, and overexpressed in AmpC-deficient *P. aeruginosa* mutant 4098. The same approach was used to clone the *bla*_{AmpC} genes from PAO1 (PDC-1), PA14 (PDC-34), and 4 clinical strains presumed to overproduce wild-type AmpCs (PDC-3, PDC-8, PDC-24, and PDC-35) because of their greater resistance to piperacillin-tazobactam than to ceftazidime (Table 1; see Table S1 in the supplemental material). As expected, the resistance levels to β-lactams conferred by these latter AmpC variants and by PDC-34 were nearly identical to that provided by PDC-1, thus confirming the absence of impact of the polymorphic variations G1D, A29T, A71V, T79A, Q129R, L150R, V179L, and G365A individually or collectively on the enzyme activity (PDCs of group 0 in Table 2). Since T79A (T105A in the nonprocessed peptide) had previously been found to be prevalent in carbapenem-nonsusceptible clinical strains (29) and to weakly increase the catalytic activity of AmpC *in vitro* on carbapenems (26), we overexpressed enzymes PDC-1 (T79) and PDC-3 (A79) in mutant 4098Δ*oprD*, reasoning that the slow penetration of carbapenems into this porin OprD-negative strain would potentiate the AmpC action and thus reveal slight differences in resistance due to T79A. In agreement with other

results (28), the variations at position 79 did not affect the resistance of 4098Δ*oprD* to carbapenems (MICs of imipenem and meropenem were equal to 4 and 2 µg/ml, respectively, with both PDCs), clearly demonstrating that T79A does not broaden the substrate spectrum of AmpC at least *in vivo*.

Based on their location in the three-dimensional (3D) structure of AmpC and their effects on β-lactam MICs, the other mutations found in this study could be assigned to 4 distinct groups, designated I to IV.

Group I PDCs. Group I mutations (V213A, G216R, E221K, E221G, and Y223H) are located in the C-terminal region of the Ω loop and in the following α-helix (Fig. 2). Compared with PDC-1, they increased the MICs of ticarcillin, aztreonam (except for PDC-80, which contains E221G), ceftazidime, and ceftolozane-tazobactam, with variable effects on resistance levels to piperacillin-tazobactam and cefepime (Table 2). Remarkably, amino acid changes at position E221 (K/G) had the greatest impact on the ceftolozane-tazobactam MIC (≥32 µg/ml ceftolozane). Reminiscent of these results, AmpC-overexpressing, ceftolozane-tazobactam-resistant clones exhibiting the E221K mutation together with F121L, Q131R, and/or V330I were selected *in vitro* from a Δ*mutS* hypermutator PAO1 mutant exposed to increasing drug concentrations (23). The Ω-loop region, which is part of the active site of the enzyme and which accommodates the R1 side chain of the β-lactam nucleus, is a well-known hot spot for mutations able to extend the substrate specificity of chromosome- or plasmid-encoded class C β-lactamases (14). Interestingly, most of the mutated amino acid residues found in *P. aeruginosa* AmpC mapped at the same position or in the vicinity of residues previously reported as cause of ESACs in other organisms, such as *E. coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter baumannii* (see details in Table S2 in the supplemental material). It should be noted here that the R100H change, which coexists with G216R in PDC-78, slightly enhanced the enzyme activity against all the β-lactams tested (compare the MICs conferred by PDC-74, -75, and -78). No predictable explanation could be found by structural analysis as this residue is situated at the surface of the protein on the back side compared with the binding pocket (Fig. 2). With the exception of PDC-50 which carries the V213A mutation, group I PDCs (PDC-74, -75, -78, -79, -80, -84, -85, and -86) turned out to be poorly antagonized by cloxacillin at 1,000 µg/ml. This observation is of practical importance as tests using this AmpC inhibitor even at high doses may fail to recognize clinical strains overproducing such variants.

Group II PDCs. Group II relates to mutations, mainly deletions, that are located in the R2 domain of AmpC (ΔT290-ΔQ295, L294P), at or near positions already known to increase the hydrolytic activity of class C β-lactamases toward third- to fourth-generation cephalosporins (see Table S2 in the supplemental material). Indeed, alterations occurring in this region, which corresponds to H-10, the N terminus of the R2 loop, are able to widen the active site, making the enzyme more accessible to β-lactam molecules carrying a bulky R2 side chain (14). Consistent with this notion and with respect to PDC-1, group II PDCs (PDC-44, -88, -89, -90, -91, and -92) conferred higher resistance to ceftazidime, cefepime, and ceftolozane-tazobactam, with no or a negative impact on the MICs of penicillins and aztreonam (Table 2). Among all of the ESACs identified in this study, the group II AmpC variants were associated with the highest resistance to cefepime (>64 µg/ml).

TABLE 2 Susceptibility profiles of strain 4098 complemented with *bla*_{AmpC} genes

PDC-producing strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a						Mutation(s) ^b
	TIC	TZP	ATM	CAZ	FEP	CZ/T	
4098(pUCP24)	16 (8)	4 (≤ 2)	4 (2)	1 (1)	1 (≤ 0.5)	0.5 (≤ 0.25)	
4098(pPDC-1) ^c	64 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
Group 0							
4098(pPDC-3)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	16 (2)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-8)	64 (16)	32 (4)	16 (2)	8 (1)	4 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-24)	64 (8)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-34)	64 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	16 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
4098(pPDC-35)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	8 (1)	8 (1)	1 (0.5)	
Group I							
4098(pPDC-50)	128 (16)	64 (4)	32 (4)	64 (2)	8 (1)	4 (0.5)	V213A
4098(pPDC-74)	256 (128)	8 (4)	128 (32)	>64 (32)	8 (4)	8 (4)	G216R
4098(pPDC-75)	256 (128)	<i>16 (8)</i>	128 (32)	>64 (64)	8 (4)	8 (4)	G216R
4098(pPDC-78)	>512 (512)	32 (16)	>128 (128)	>64 (>64)	16 (16)	16 (16)	G216R, R100H
4098(pPDC-79)	256 (128)	<i>16 (16)</i>	32 (16)	>64 (64)	16 (8)	64 (32)	E221K
4098(pPDC-80)	128 (64)	32 (16)	16 (8)	64 (16)	4 (2)	32 (8)	E221G
4098(pPDC-85)	256 (64)	<i>16 (4)</i>	32 (8)	32 (8)	8 (2)	4 (4)	Y223H
4098(pPDC-86)	256 (128)	<i>16 (16)</i>	32 (32)	>64 (>64)	16 (8)	>64 (64)	E221K
Group II							
4098(pPDC-44)	32 (16)	<i>16 (4)</i>	8 (2)	64 (4)	>64 (4)	2 (0.5)	L294P
4098(pPDC-88)	64 (16)	64 (4)	16 (2)	64 (2)	>64 (4)	4 (0.5)	Δ (T290-P291)
4098(pPDC-89)	32 (16)	32 (8)	16 (4)	>64 (16)	>64 (32)	8 (2)	Δ (T290-M292)
4098(pPDC-90)	<i>16 (16)</i>	<i>16 (4)</i>	8 (2)	>64 (8)	>64 (16)	4 (1)	Δ (T290-M292)
4098(pPDC-91)	32 (16)	64 (8)	32 (8)	>64 (16)	>64 (64)	16 (2)	Δ (T290-A293)
4098(pPDC-92)	32 (16)	32 (4)	16 (4)	64 (8)	>64 (16)	4 (1)	Δ (L294-Q295)
Group III							
4098(pPDC-73)	128 (16)	64 (≤ 2)	32 (2)	64 (2)	16 (1)	8 (1)	P154L
4098(pPDC-81)	128 (16)	64 (≤ 2)	16 (2)	64 (2)	16 (2)	8 (1)	P154L
4098(pPDC-82)	128 (32)	32 (8)	16 (4)	64 (8)	8 (2)	16 (8)	F121L, M175L
Group IV							
4098(pPDC-76)	32 (16)	<i>16 (4)</i>	16 (4)	>64 (16)	16 (2)	4 (1)	N347I
4098(pPDC-87)	64 (16)	32 (8)	32 (4)	>64 (32)	32 (8)	8 (2)	N347I
Groups I + IV							
4098(pPDC-84)	32 (16)	<i>16 (4)</i>	64 (16)	>64 (64)	32 (8)	16 (4)	V213A, N347I

^a Abbreviations: TIC, ticarcillin; TZP, piperacillin plus tazobactam at a fixed concentration of 4 $\mu\text{g/ml}$; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CZ/T, ceftolozane plus tazobactam at a fixed concentration of 4 $\mu\text{g/ml}$. Shown are values from at least two independent experiments. Values in parentheses correspond to the MICs for bacteria grown in the presence of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ cloxacillin. MIC values in boldface are at least 4-fold higher and those in italics are at least 4-fold lower than those for 4098(pPDC-1). MIC values of imipenem and meropenem were equal to 0.5 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$, respectively, for all strains tested.

^b Shown are mutations different from common polymorphisms G1D, A29T, A71V, T79A, Q129R, L150R, V179L, V330I, and G365A.

^c *bla*_{AmpC} genes cloned on broad-spectrum plasmid pUCP24.

Group III PDCs. P154 and F121, which are situated near the conserved YSN loop (at the extremity of H-5 and in loop $\alpha 3$ - $\alpha 4$, respectively) are predicted to interact by making a stacking involving their aromatic side chains. According to this model, mutations P154L and F121L that occur in PDC-73, -81, or -82 are expected to abrogate this interaction, forcing loop $\alpha 3$ - $\alpha 4$ to move away, enlarging the substrate binding pocket, with consequent modification of AmpC substrate specificity (Fig. 2). Supporting this hypothesis, both mutations resulted in similar effects on β -lactam MICs, with a strong increase in resistance of strain 4098 to ceftazidime and ceftolozane-tazobactam relative to PDC-1 (Table 2). As mentioned above, F121L was already found to coexist with group I mutation E221K in a ceftolozane-tazobactam-resistant mutant selected *in vitro*; however, its contribution to the whole

resistance of the mutant was not investigated further (23). M175L, concurrent with F121L in PDC-82, is localized in H-6 sided to H-6'' involved in the substrate-binding site at the C terminus of the Ω loop. Its mutation into leucine would require a small rearrangement of the surrounding region, but without clear knowledge on the necessary movements. To our knowledge, mutations at positions corresponding to P154 and F121 in *P. aeruginosa* AmpC have not been identified in other class C β -lactamases.

Group IV PDCs. Group IV is characterized by the N347I substitution as found in PDC-76, -84 (in combination with V213A), and -87. Reminiscent of the phenotype associated with these AmpC variants, N347I was reported to increase the activity of plasmid-determined enzyme CMY-2 and *Enterobacter* AmpC on cephalosporins ceftazidime and cefepime (30, 31) (see Table S2 in

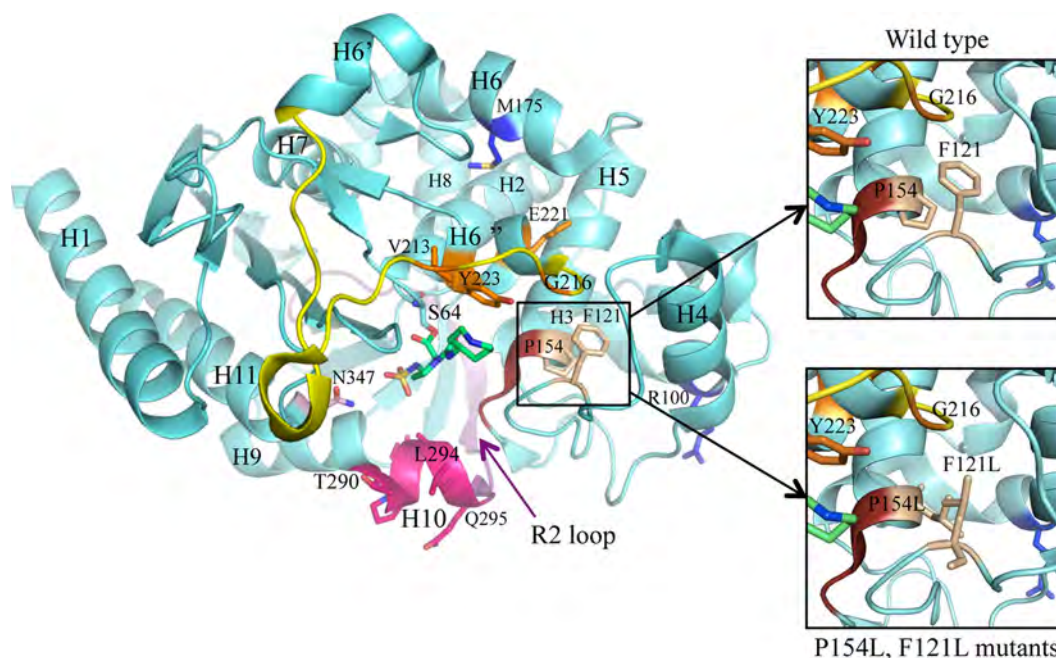


FIG 2 Representation of the AmpC β -lactamase structure from the *P. aeruginosa* PAO1 strain (light blue) in complex with an inhibitor (green) (PDB code 2WZZ) (41). The different structural regions lining the binding site are colored as follows: omega loop, yellow; helix H-10, pink; R2 loop, purple; and YSN, brick. The amino acids highlighted in this study as playing an important role in ESAC emergence are colored in terms of the function of their pertaining group (see the text): group I, orange; group II, pink; group III, wheat; and group IV, light pink. The two other mutants (M175L and R100H) found in combination with some from the other groups are colored in blue.

the supplemental material). According to the results of site-directed mutagenesis experiments and structural studies, the highly conserved N347 (346 in *E. coli* AmpC) is part of the C₃/C₄ carboxylate recognition region that directly contributes to substrate positioning in the catalytic site of class C enzymes through hydrogen bonding (32). How N347I affects this positioning and accounts for the phenotype associated with group IV PDCs is unclear so far.

Because of the structural plasticity of class C β -lactamases, enabling them to accommodate new substrates when mutated in specific regions, one could assume that coexistence of mutations in several of these regions would further increase the activity of AmpC enzymes toward newer cephalosporins and/or carbapenems. Actually, this was not verified here, as the occurrence of two ESAC-associated mutations in the same enzyme (PDC-84), namely, V213A (group I) and N347I (group IV), did not result in significant additive effects on the levels of resistance to cephalosporins and did not impact carbapenem MICs (Table 2).

Finally, the data presented above confirmed that the common polymorphism, which also includes V330I in *P. aeruginosa*, has no or negligible impact on AmpC activity when combined with ESAC-associated mutations (compare PDC-74 and PDC-75, PDC-79 and PDC-86, PDC-89 and PDC-90, PDC-73 and PDC-81, and PDC-76 and PDC-87 in Table 2).

Strain genotyping. The clonal relatedness of the 31 ESAC-producing *P. aeruginosa* strains was investigated by MLST. The bacteria could be grouped into 14 different sequence types (STs), some of which correspond to widespread clonal complexes or clones, such as ST175 ($n = 5$ isolates), ST235 ($n = 3$), ST260 ($n = 1$), ST298 ($n = 1$), ST308 ($n = 4$), ST309 ($n = 1$), and ST313 ($n = 2$) (33) (see Table S1 in the supplemental material). Interestingly, most of the strains isolated in the context of cystic fibrosis ap-

peared to belong to clones already found associated with this pathology, such as ST170 ($n = 1$), ST242 ($n = 2$), ST282 ($n = 2$), and ST274 ($n = 4$) (34–36). Our genotypic analysis also revealed the occurrence of clonally related isolates producing PDC-44 ($n = 2$), PDC-75 ($n = 2$), PDC-87 ($n = 2$), and PDC-92 ($n = 2$) in distinct institutions. With the exception of PDC-77 found in ST175 isolates from 3 distant cities (i.e., which suggests a geographical diffusion of a single clone), our results provide evidence that the ESACs emerged locally in genotypically distinct and rather prevalent *P. aeruginosa* clones (see Table S1). Since 15 (48.4%) ESAC-producing isolates came from chronically infected patients with cystic fibrosis ($n = 10$) or chronic obstructive pulmonary disease (COPD [$n = 5$]), we asked whether hypermutability, which is common in these diseases (37), was required for the emergence of ESAC-associated mutations, as suggested elsewhere (23, 38). Actually, only 1 (CF isolate 12.1111) out of 10 randomly selected ESAC strains (the other 9 strains including 5 CF, 1 COPD, and 3 non-CF, non-COPD isolates) turned out to give rise to rifampin-resistant mutants at rates significantly higher (≥ 20 -fold) than those of reference strain PAO1 (10^{-8}) and to fit with the definition of hypermutator (39; data not shown).

Conclusions. Despite differences in their amino acid sequences, class C β -lactamases share the same general structure and conserved sequence motifs near the active-site serine (14). So, it is not surprising *per se* that mutations occurring in specific regions of the substrate binding pocket, such as the Ω loop, the R2 domain, or the C-terminal domain, result in conformational changes prone to enhance the catalytic efficiencies of these enzymes toward poor substrates. Like in other Gram-negative species, these mutations increase the hydrolytic activity of *P. aeruginosa* AmpC on cephalosporins (ceftazidime, cefepime, and/or

ceftolozane), with mitigated effects on penicillins and/or aztreonam (14). Our assumption that P154L and F121L (which apparently belong to a new group of mutations) prevent the interaction between P154 and F121, with consequent remodeling of the substrate cavity, needs to be substantiated by crystallography experiments. In this work, none of the ESACs studied could increase the resistance of *P. aeruginosa* to carbapenems. Furthermore, confirming other data (28), we could not demonstrate any effect of the T79A substitution on carbapenem MICs even in the low-outer-membrane-permeability mutant 4098 Δ *oprD*, consistent with T79 being distant from the active site, at the surface of the protein, in a hydrophobic environment showing no evidence of negative consequence of replacing a threonine by an alanine.

The prevalence of ESAC-producing strains among clinical *P. aeruginosa* isolates is still largely unknown. In the collection of the French NRC, mainly composed of β -lactam-resistant bacteria, 31 of 2,040 isolates (1.5%) were characterized as ESAC producers. However, sequencing of gene *bla*_{AmpC} was not systematic and only applied to those strains exhibiting uncommon phenotypes (higher resistance to ceftazidime than to piperacillin-tazobactam) and devoid of secondary β -lactamases (ESBLs or carbapenemases), so we cannot rule out the possibility that the use of specific phenotypic criteria to screen for ESACs may miss bacteria in which these variants are phenotypically masked by other resistance mechanisms (e.g., active efflux pumps, penicillin-binding protein [PBP] alterations). Alternatively, some ESACs may well be responsible for phenotypes that are different from those reported here. Interestingly, we examined the recently released AmpC sequences of 531 *P. aeruginosa* isolates collected in 25 different countries and associated with multiple clinical situations (15). This search revealed the presence of 9 strains (1.7%) harboring several of the mutations described in this study (including 7 strains with V231A, 1 with L294P, and 1 with N347I). Therefore, if one considers that still unreported ESAC-associated mutations are likely to occur in the clinical setting, the prevalence of AmpC variants should be higher than 2%. That AmpC variants conferring high resistance to ceftolozane (in combination with tazobactam) preexist the introduction of this AmpC-stable molecule into clinical practice is of particular interest (40). Although clinical data were not available in this study, one can assume that older antipseudomonal cephalosporins (ceftazidime and cefepime) cross-selected resistance to this new antibiotic. Therefore, in the future it will be necessary to pay a special attention to the emergence of ceftolozane-resistant mutants under treatment since AmpC does not necessarily require hypermutability to give rise to ESACs in *P. aeruginosa*. The use of cloxacillin as an AmpC inhibitor may fail to characterize these variants, which as shown here, can potentially emerge in epidemic clones.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the following clinical microbiologists for their collaboration with the NRC: T. Hadou (Nancy), B. Alves Pereira (Wissous), O. Belmonte (Saint Denis de la Réunion), H. Boulestreau and N. Milpied (Bordeaux), J. Caillon (Nantes), D. Chrisment (Pessac), B. Compan and H. Jean-Pierre (Montpellier), F. Gouriet (Marseille), T. Lambert (Paris), V. Nègre (Martigues), E. Petat (Bellegarde), E. Pluquet and H. Guillon (Amiens), C. Recule (Grenoble), C. Segonds (Toulouse), G. Suermondt (Bourg Saint Maurice), A. Tachet (Pau), D. Tandé (Brest), B. Vaché (Gap), and N. Van Der Mee (Tours). We also thank Barbara Dehecq, Emeline Gilliot, Amélie Mille, and Pauline Chatelain for excellent technical assistance.

Ceftolozane-tazobactam was provided by Cubist Pharmaceuticals. VYNE was supported by the cystic fibrosis associations Vaincre la Mucoviscidose and Association Grégory Lemarchal. The French NRC for Antibiotic Resistance is funded by the French Ministry of Health through the InVS agency.

REFERENCES

- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582–610. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
- Sabath LD, Jago M, Abraham EP. 1965. Cephalosporinase and penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. *Biochem J* 96:739–752.
- Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. 1999. Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:400–402.
- Livermore DM, Williams RJ, Lindridge MA, Slack RC, Williams JD. 1982. *Pseudomonas aeruginosa* isolates with modified beta-lactamase inducibility: effects on beta-lactam sensitivity. *Lancet* i:1466–1467.
- Fung-Tomc J, Dougherty TJ, DeOrio FJ, Simich-Jacobson V, Kessler RE. 1989. Activity of cefepime against ceftazidime- and cefotaxime-resistant Gram-negative bacteria and its relationship to beta-lactamase levels. *Antimicrob Agents Chemother* 33:498–502. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.33.4.498>.
- Moya B, Dötsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A. 2009. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a non-essential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* 5:e1000353. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000353>.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodriguez C, Moyà B, Pena C, Martinez-Martinez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6349–6357. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01388-12>.
- Castanheira M, Mills JC, Farrell DJ, Jones RN. 2014. Mutation-driven β -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6844–6850. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03681-14>.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. 2007. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4062–4070. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00148-07>.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodriguez C, Moya B, Zamorano L, Suarez C, Pena C, Martinez-Martinez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1906–1911. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01645-10>.
- Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallee M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, Marty N, Grattard F, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Husson M-O, Couedic G, Plésiat P. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3531–3536. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00503-07>.
- Moya B, Zamorano L, Juan C, Perez JL, Ge Y, Oliver A. 2010. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected *in vitro* and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1213–1217. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01104-09>.
- Mushtaq S, Warner M, Livermore DM. 2010. *In vitro* activity of ceftazidime+NXL104 against *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermenters. *J Antimicrob Chemother* 65:2376–2381. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq306>.
- Jacoby GA. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161–182. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.
- Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PL, McLaughlin RE, Olivier NB, Alm RA. 2014. Avibactam and class C β -lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Anti-*

- microb Agents Chemother 58:5704–5713. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03057-14>.
16. Holloway BW. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol 13:572–581. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>.
 17. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tomkins RG, Ausubel FM. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268:1899–1902. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7604262>.
 18. Bryan LE, Kwan S, Godfrey AJ. 1984. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* mutants with altered control of chromosomal β -lactamase to piperacillin, ceftazidime, and cefsulodin. Antimicrob Agents Chemother 25:382–384. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.25.3.382>.
 19. Richardot C, Plésiat P, Fournier D, Monlezun L, Broutin I, Llanes C. 2015. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. Int J Antimicrob Agents 45:529–532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.029>.
 20. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 148:81–86. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90237-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(94)90237-2).
 21. CLSI. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 22. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 42:5644–5649. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
 23. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moya B, Juan C, Haussler S, Oliver A. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. Antimicrob Agents Chemother 58:3091–3099. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02462-13>.
 24. Dumas J-L, vanDelden C, Perron K, Köhler T. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol Lett 254:217–225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x>.
 25. Jo JTH, Brinkman FSL, Hancock REW. 2003. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 47:1101–1111. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.3.1101-1111.2003>.
 26. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. 2009. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 53:1766–1771. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01410-08>.
 27. Tam VH, Schilling AN, LaRocco MT, Gentry LO, Lolans K, Quinn JP, Garey KW. 2007. Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 13:413–418. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01674.x>.
 28. Zamorano L, Moya B, Juan C, Oliver A. 2010. Differential β -lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Antimicrob Chemother 65:1540–1542. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq142>.
 29. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 53:4783–4788. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00574-09>.
 30. Dahyot S, Broutin I, de Champs C, Guillon H, Mammeri H. 2013. Contribution of asparagine 346 residue to the carbapenemase activity of CMY-2. FEMS Microbiol Lett 345:147–153. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12199>.
 31. Livermore DM, Mushtaq S, Barker K, Hope R, Warner M, Woodford N. 2012. Characterization of beta-lactamase and porin mutants of *Enterobacteriaceae* selected with ceftaroline + avibactam (NXL104). J Antimicrob Chemother 67:1354–1358. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks079>.
 32. Drawz SM, Taracila M, Caselli E, Prati F, Bonomo RA. 2011. Exploring sequence requirements for C3/C4 carboxylate recognition in the *Pseudomonas aeruginosa* cephalosporinase: insights into plasticity of the AmpC β -lactamase. Protein Sci 20:941–958. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.612>.
 33. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 35:736–755. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
 34. Fernandez-Olmos A, Garcia-Castillo M, Alba JM, Morosini MI, Lamas A, Romero B, Galan JC, del Campo R, Canton R. 2013. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 51:2761–2765. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00802-13>.
 35. Garcia-Castillo M, Maiz L, Morosini MI, Rodriguez-Banos M, Suarez L, Fernandez-Olmos A, Baquero F, Canton R, del Campo R. 2012. Emergence of a *mutL* mutation causing multilocus sequence typing-pulsed-field gel electrophoresis discrepancy among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol 50:1777–1778. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05478-11>.
 36. Warren AE, Boulianne-Larsen CM, Chandler CB, Chiotti K, Kroll E, Miller SR, Taddei F, Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, McInerney K, Franklin MJ, Rosenzweig F. 2011. Genotypic and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* reveals signatures of secondary infection and mutator activity in certain cystic fibrosis patients with chronic lung infections. Infect Immun 79:4802–4818. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05282-11>.
 37. Oliver A, Mena A. 2010. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect 16:798–808. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03250.x>.
 38. Crémet L, Caroff N, Giraudeau C, Reynaud A, Caillon J, Corvec S. 2013. Detection of clonally related *Escherichia coli* isolates producing different CMY β -lactamases from a cystic fibrosis patient. J Antimicrob Chemother 68:1032–1035. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks520>.
 39. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science 288:1251–1254. <http://dx.doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>.
 40. Zhanel GG, Chung P, Adam H, Zelenitsky S, Denisuk A, Schweizer F, Lagace-Wiens PR, Rubinstein E, Gin AS, Walkty A, Hoban DJ, Lynch JP, Karlowsky JA. 2014. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant Gram-negative bacilli. Drugs 74:31–51. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-013-0168-2>.
 41. Blizzard TA, Chen H, Kim S, Wu J, Young K, Park YW, Ogawa A, Raghoobar S, Painter RE, Hairston N, Lee SH, Misura A, Felcetto T, Fitzgerald P, Sharma N, Lu J, Ha S, Hickey E, Hermes J, Hammond ML. 2010. Side chain SAR of bicyclic beta-lactamase inhibitors (BLIs). 1. Discovery of a class C BLI for combination with imipenem. Bioorg Med Chem Lett 20:918–921. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.069>.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse, dont l'objectif était la caractérisation structurale et fonctionnelle des pompes à efflux de *P. aeruginosa*, s'articulaient autour de trois principaux axes :

- ✚ la caractérisation structurale du canal OprN, de la pompe MexEF-OprN,
- ✚ la caractérisation structurale et fonctionnelle de l'ouverture du canal OprM, des pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM,
- ✚ la caractérisation de la pompe MexXY, spécifique des aminoglycosides.

La pompe MexEF-OprN joue un rôle prépondérant dans l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones, classe d'antibiotiques la plus utilisée avec les β -lactamines. Nous avons montré, grâce à la résolution de la structure cristallographique du canal OprN, que la protéine partage une architecture commune avec une autre OMF de *P. aeruginosa* (OprM), mais également avec les OMFs d'autres bactéries Gram négatif. Elle présente cependant des différences structurales, notamment au niveau du domaine équatorial qui a été décrit comme étant la région d'interaction avec le partenaire MFP, mais également au niveau du réseau d'interactions qui stabilisent la conformation fermée du canal et de la potentielle surface d'interaction avec son partenaire MFP le long du domaine coiled-coil.

Son homologue OprM, ainsi que TolC d'*E. coli* ont été décrits comme étant des protéines multifonctionnelles, capables de fonctionner avec différentes familles de transporteurs. Des études d'interaction (cross-link, ITC, SPR) ou encore la construction de mutants « gain de fonction », ainsi que la reconstitution de pompes natives ou chimériques (notamment en protéoliposomes) pourront être envisagées pour OprN afin d'identifier et de caractériser les résidus qui sont responsables de la spécificité d'interaction avec ses partenaires MexE et MexF ainsi que de l'ouverture du canal, et qui expliquent les différences entre ce canal et les autres OMFs, notamment OprM. Des analyses sur gel natif, initiées par L. Monlezun durant sa thèse pour les protéines OprM et MexA, sont d'ores et déjà en cours afin de caractériser l'interaction OMF-MFP au sein de complexes bipartites natifs ou chimériques. Cette étude pourra être étendue aux complexes bipartites MFP-RND. Ces complexes bipartites pourront également être étudiés au niveau structural afin d'améliorer la compréhension du mécanisme d'assemblage. Des essais de co-expression sont actuellement en cours afin d'essayer de co-cristalliser les protéines OMF et MFP.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La structure d'OprN a cependant été résolue en conformation fermée comme pour OprM. Or, le passage des substrats nécessite l'ouverture du canal. Afin d'identifier les résidus impliqués dans cette ouverture, des mutants (simples, double et quadruple) artificiellement ouverts d'OprM (dont la structure avait été résolue précédemment au laboratoire par Gilles Phan), ont été analysés *in vitro*, par cristallographie et *in vivo*, par complémentation. La structure cristallographique du quadruple mutant que nous avons résolue peut être assimilée aux premières étapes d'ouverture du canal. Elle a permis de montrer un mécanisme d'ouverture séquentiel « iris-like », en accord avec les données bibliographiques disponibles pour TolC d'*E. coli* ou encore MtrE de *Neisseria gonorrhoeae*. Le canal reste cependant trop peu ouvert pour permettre une analyse poussée du mécanisme d'ouverture, indiquant ainsi l'implication d'autres résidus. Il s'agira donc de générer de nouveaux mutants permettant une ouverture plus importante. Le résidu Leu412, qui est conservé au sein des OMFs de *P. aeruginosa*, semble constituer le dernier verrou à desceller pour ouvrir le canal de façon conséquente. Des clonages sont actuellement en cours afin de caractériser ce mutant aussi bien *in vitro* au niveau structural qu'*in vivo* au niveau fonctionnel.

De plus, les analyses par complémentation *in vivo*, initiées par L. Monlezun au cours de sa thèse, ont permis de montrer des effets variables sur la résistance selon les résidus mutés et les classes d'antibiotiques envisagées. Nous avons montré que, dans le vecteur pUCP24, seul le quadruple mutant entraîne une sensibilité accrue à la plupart des antibiotiques testés chez la bactérie, à l'exception des aminoglycosides. Il serait intéressant d'étudier ce mutant à l'aide de techniques complémentaires (ITC, SPR, gel natif, reconstitution en protéoliposomes), en présence de ses partenaires. Par ailleurs, nous disposons au laboratoire d'une souche de *P. aeruginosa* délétée des 4 pompes majeures impliquées dans la résistance aux antibiotiques (MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ) ainsi que des pompes MexJK, TriABC et du canal OpmH, qui nous a été donnée récemment par le Pr Helen Zgurskaya (Université d'Oklahoma, USA). Elle pourra être utilisée pour tester spécifiquement chacune des pompes d'intérêt, sans ambiguïté d'interprétation due à la possible compensation de la bactérie par une surexpression des autres pompes.

En parallèle, nous nous sommes également intéressés au transporteur MexY de la pompe MexXY. Après plusieurs essais infructueux, nous avons réussi à exprimer le

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

transporteur sous forme soluble, grâce à la co-expression avec son partenaire MFP, en utilisant un vecteur bicistronique. Cependant, le transporteur est purifié sans sa MFP et sous forme de monomère, ce qui rend difficile les essais de cristallisation initiés au cours de cette thèse, car la protéine fonctionnelle est trimérique. Il s'agira donc de déterminer les conditions qui permettent de stabiliser le trimère avant de réaliser les essais de cristallisation. Une alternative sera de co-purifier le transporteur avec son partenaire MFP en essayant de stabiliser le complexe. Actuellement, les deux protéines peuvent être co-purifiées, mais l'interaction ne semble pas suffisamment forte pour conserver le complexe bipartite en présence des détergents classiques (DDM) utilisés au cours de la purification. Une analyse de cette interaction pourra être envisagée en présence de différents détergents, afin de déterminer ceux qui stabilisent le complexe.

Bien que de nombreuses questions restent à élucider, ces travaux auront permis d'apporter un éclairage nouveau sur le mode de fonctionnement commun mais également sur les divergences entre deux pompes d'efflux au sein de *P. aeruginosa* et une pompe d'efflux au sein d'*E. coli*. En effet, peu de données étaient disponibles chez *P. aeruginosa*, notamment au niveau structural, car la pompe la mieux caractérisée à ce jour chez cette bactérie reste la pompe MexAB-OprM. L'élargissement des connaissances aussi bien structurales que fonctionnelles sur les similitudes et les différences entre les pompes d'efflux, permettra de développer des inhibiteurs capables de cibler de façon irréversible, non pas une seule pompe, mais plusieurs d'entre elles. Ils permettront ainsi de restaurer l'efficacité de l'arsenal thérapeutique préexistant.

BIBLIOGRAPHIE

- Aires, J. R., Köhler, T., Nikaido, H., & Plésiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(11), 2624–2628.
- Aires, J. R., Pechère, J. C., Van Delden, C., & Köhler, T. (2002). Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2169–2173. doi: 10.1128/AAC.46.7.2169-2173.2002.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., ... Nakae, T. (2004). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: Dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 52816–52819. doi: 10.1074/jbc.C400445200.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S. I., Tsukihara, T., ... Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25939–25942. doi: 10.1074/jbc.C400164200.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. doi: 10.1021/bi5000564.
- Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., & Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11103–11108. doi: 10.1073/pnas.162039399.
- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6(June), 587. doi: 10.3389/fmicb.2015.00587.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., De Kruijff, B., Runswick, M. J., & Walker, J. E. (2000). Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F1F_o ATP synthase. *FEBS Letters*, 482(3), 215–219. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02054-8.
- Arimoto, T., & Igarashi, T. (2008). Role of prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) and lipoprotein-specific signal peptidase II (LspA) in localization and physiological function of lipoprotein MsmE in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6), 515–519. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00455.x.
- Aubry, A., Veziris, N., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., & Fisher, L. M. (2006). Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: Functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 104–112. doi: 10.1128/AAC.50.1.104-112.2006.
- Bai, J., Bhagavathi, R., Tran, P., Muzzarelli, K., Wang, D., & Fralick, J. A. (2014). Evidence that the C-terminal region is involved in the stability and functionality of OprM in *E. coli*. *Microbiological Research*, 169(5-6), 425–431. doi: 10.1016/j.micres.2013.08.006.
- Bai, J., Mosley, L., & Fralick, J. A. (2010). Evidence that the C-terminus of OprM is involved in the assembly of the VceAB-OprM efflux pump. *FEBS Letters*, 584(8), 1493–1497. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.066.
- Baum, E. Z., Crespo-Carbone, S. M., Morrow, B. J., Davies, T. A., Foleno, B. D., He, W., ... Bush, K. (2009). Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2785–2790. doi: 10.1128/AAC.00018-09.

- Baumgärtner, M., Kärst, U., Gerstel, B., Loessner, M., Wehland, J., & Jänsch, L. (2007). Inactivation of Lgt allows systematic characterization of lipoproteins from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 313–324. doi: 10.1128/JB.00976-06.
- Bavro, V. N., Pietras, Z., Furnham, N., Pérez-Cano, L., Fernandez-Recio, J., Pei, X. Y., ... Luisi, B. (2008). Assembly and Channel Opening in a Bacterial Drug Efflux Machine. *Molecular Cell*, 30(1), 114–121. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.015.
- Bavro, V. N., Pietras, Z., Furnham, N., Pérez-Cano, L., Fernández-Recio, J., Pei, X. Y., ... Luisi, B. (2008). Assembly and Channel Opening in a Bacterial Drug Efflux Machine. *Molecular Cell*, 30(1), 114–121. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.015.
- Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., & Plésiat, P. (2015). Mutations in beta-lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6248–6255.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. V. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 42(13), 42–51. doi: 10.1039/c0cc05111j.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., & Haas, D. (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14073–14078. doi: 10.1073/pnas.96.24.14073.
- Bokma, E., Koronakis, E., Lobedanz, S., Hughes, C., & Koronakis, V. (2006). Directed evolution of a bacterial efflux pump: Adaptation of the *E. coli* TolC exit duct to the *Pseudomonas MexAB* translocase. *FEBS Letters*, 580(22), 5339–5343. doi: 10.1016/j.febslet.2006.09.005.
- Bolla, J. R., Su, C.-C., Do, S. V., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., ... Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrD inner membrane multidrug efflux pump. *PloS One*, 9(6), e97903. doi: 10.1371/journal.pone.0097903.
- Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Infect.Dis.*, 43 Suppl 2(1537-6591 (Electronic)), S49–S56. doi: 10.1086/504477.
- Brown, D. G., May-Dracka, T. L., Gagnon, M. M., & Tommasi, R. (2014). Trends and exceptions of physical properties on antibacterial activity for Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(23), 10144–10161. doi: 10.1021/jm501552x.
- Bunikis, I., Denker, K., Östberg, Y., Andersen, C., Benz, R., & Bergström, S. (2008). An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *PLoS Pathogens*, 4(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1000009.
- Bush, K., & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102911.
- Buyck, J. M., Plésiat, P., Traore, H., Vanderbist, F., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2012). Increased Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to macrolides and ketolides in eukaryotic cell culture media and biological fluids due to decreased expression of oprM and increased outer-membrane permeability. *Clinical Infectious Diseases*, 55(4), 534–542. doi: 10.1093/cid/cis473.

- Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J., & Oliver, A. (2016). Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation supply rates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(January), AAC.02676–15. doi: 10.1128/AAC.02676-15.
- Cao, L., Srikumar, R., & Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1423–1436. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04210.x.
- Castanheira, M., Mills, J. C., Farrell, D. J., & Jones, R. N. (2014). Mutation-Driven β -Lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), 6844–6850. doi: 10.1128/AAC.03681-14.
- Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2015). A more flexible lipoprotein sorting pathway. *Journal of Bacteriology*, 197(10), 1702–1704. doi: 10.1128/JB.00051-15.
- Chambless, J. D., Hunt, S. M., & Stewart, P. S. (2006). A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2005–2013. doi: 10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12–21. doi: 10.1107/S09074444909042073.
- Chuanchien, R., Murata, T., Gotoh, N., & Schweizer, H. P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2133–2136. doi: 10.1128/AAC.49.5.2133-2136.2005.
- Courvalint, P., & Arthur, M. (1993). MINIREVIEW Genetics and Mechanisms of Glycopeptide Resistance in Enterococci, 37(8), 1563–1571. doi: 10.1128/AAC.37.8.1563.Updated.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287–292. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Cramer, a, Whitehorn, E. a, Tate, E., & Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology*, 14(3), 315–319. doi: 10.1038/nbt0396-315.
- Daigle, D. M., Cao, L., Fraud, S., Wilke, M. S., Pacey, A., Klinoski, R., ... Poole, K. (2007). Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5441–5451. doi: 10.1128/JB.00543-07.
- Daur, L., Orange, F., Taveau, J., & Verchère, A. (2016). Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps, 1–30. doi: 10.1038/ncomms10731.
- De Angelis, F., Lee, J. K., O’Connell, J. D., Miercke, L. J. W., Verschueren, K. H., Srinivasan, V., ... Vandenburg, G. (2010). Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 11038–11043. doi: 10.1073/pnas.1003908107.

- Dean, C. R., Visalli, M. a, Projan, S. J., Sum, P., & Bradford, P. a. (2003). Efflux-Mediated Resistance to Tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 972–78. doi: 10.1128/AAC.47.3.972.
- Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 808–816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.Outer.
- Delisa, M. P., Tullman, D., & Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway, 100(10).
- Delmar, J. A., Su, C.-C., & Yu, E. W. (2013). Structural Mechanisms of heavy-metal extrusion by the Cus efflux system. *Biometals*, 26(4), 593–6079. doi: 10.1007/s10534-013-9628-0.
- Doi, Y., Ghilardi, A. C. R., Adams, J., De Oliveira Garcia, D., & Paterson, D. L. (2007). High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3388–3390. doi: 10.1128/AAC.00443-07.
- Dreier, J., & Ruggerone, P. (2015). Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6(July), 660. doi: 10.3389/fmicb.2015.00660.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-, T., ... Luisi, B. F. (2015). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509(7501), 512–515. doi: 10.1038/nature13205.Structure.
- Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., ... Luisi, B. F. (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509(7501), 512–515. doi: 10.1038/nature13205.
- E. Sauvage, M. T. (2016). Glycosyltransferases and Transpeptidase/Penicillin-binding Proteins: Valuable Targets for new Antibacterials. *Antibiotics*, 5(1), 12.
- Eda, S., Maseda, H., & Nakae, T. (2003). An elegant means of self-protection in Gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2085–2088. doi: 10.1074/jbc.C200661200.
- Eicher, T., Cha, H., Seeger, M. a, Brandstätter, L., El-Delik, J., Bohnert, J. a, ... Pos, K. M. (2012). Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5687–92. doi: 10.1073/pnas.1114944109.
- Eicher, T., Seeger, M. A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., ... Pos, K. M. (2014). Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *eLife*, 3, e03145. doi: 10.7554/eLife.03145.
- Elena B. M. Breidenstein, César de la Fuente-Nunez, R. E. W. H. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426.
- Elkins, C. a, & Nikaido, H. (2002). Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *S. typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 6490–6498. doi: 10.1074/jbc.M209472001.
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2126–2132. doi: 10.1107/S0907444904019158.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486–501. doi: 10.1107/S0907444910007493.

- Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKeegan, K. S., ... Walmsley, A. R. (2005). The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15307–15314. doi: 10.1074/jbc.M500401200.
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661–681. doi: 10.1128/CMR.00043-12.
- Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh Pratap, J., Bavro, V. N., Miguel, R. N., ... Luisi, B. (2004). A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 578(1-2), 5–9. doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.097.
- Ferrandez, Y., Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Benas, P., Ulryck, N., ... Broutin, I. (2012). Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 33(8), 1282–1287. doi: 10.1002/elps.201100541.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L., & Earhart, C. F. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology*, 115(3), 717–22.
- Fukuda, A., Matsuyama, S. I., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H., & Tokuda, H. (2002). Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43512–43518. doi: 10.1074/jbc.M206816200.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607. doi: 10.1385/1-59259-890-0:571.
- Gillis, R. J., White, K. G., Choi, K.-H., Wagner, V. E., Schweizer, H. P., & Iglewski, B. H. (2005). Molecular Basis of Azithromycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(9), 3858–3867. doi: 10.1128/AAC.49.9.3858.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nomura, A., Okamoto, K., Tsuda, M., & Nishino, T. (1998). Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), 21–27. doi: 10.1016/S0378-1097(98)00250-X.
- Greene, N. P., Hinchliffe, P., Crow, A., Ababou, A., Hughes, C., & Koronakis, V. (2013). Structure of an atypical periplasmic adaptor from a multidrug efflux pump of the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *FEBS Letters*, 587(18), 2984–2988. doi: 10.1016/j.febslet.2013.06.056.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., Repressor, A., & Subtilis, B. (2006). Regulation of Bacterial Drug Export Systems, 66(4), 671–701. doi: 10.1128/MMBR.66.4.671.
- Gurung, M., Moon, D. C., Tamang, M. D., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., ... Lee, J. C. (2010). Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), 468–470. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.021.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121–4130. doi: 0021-9193/95.
- Hagan, C. L., Silhavy, T. J., & Kahne, D. (2011). β-Barrel Membrane Protein Assembly by the Bam Complex. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 189–210. doi: 10.1146/annurev-biochem-061408-144611.

- Hainrichson, M., Nudelman, I., & Baasov, T. (2008). Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org Biomol Chem*, 6(2), 227–239. doi: 10.1039/b712690p.
- Hassan, K. A., Elbourne, L. D. H., Li, L., Gamage, H. K. A. H., Liu, Q., Jackson, S. M., ... Paulsen, I. T. (2015). An ace up their sleeve: A transcriptomic approach exposes the AceI efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). doi: 10.3389/fmicb.2015.00333.
- Hassan, K. A., Liu, Q., Henderson, P. J. F., & Paulsen, I. T. (2015). Homologs of the *Acinetobacter baumannii* aceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *mBio*, 6(1), 1–5. doi: 10.1128/mBio.01982-14.
- Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 9994–9999. doi: 10.1073/pnas.0400375101.
- Higgins, P. G., Fluit, A. C., Milatovic, D., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2003). Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), 409–413. doi: 10.1016/S0924-8579(03)00009-8.
- Hinchliffe, P., Greene, N. P., Paterson, N. G., Crow, A., Hughes, C., & Koronakis, V. (2014). Structure of the periplasmic adaptor protein from a major facilitator superfamily (MFS) multidrug efflux pump. *FEBS Letters*, 588(17), 3147–3153. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.055.
- Hobbs, E. C., Yin, X., Paul, B. J., Astarita, J. L., & Storz, G. (2012). Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16696–16701. doi: 10.1073/pnas.1210093109.
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., & Plésiat, P. (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1347–1351. doi: 10.1128/AAC.50.4.1347-1351.2006.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z. Y., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. doi: 10.1038/Nature03912.
- Hooper, D. C. (1993). Mechanisms of bacterial resistance to quinolones, 01805(Suppl 2), 97 – 118.
- Hung, L. W., Kim, H. B., Murakami, S., Gupta, G., Kim, C. Y., & Terwilliger, T. C. (2013). Crystal structure of AcrB complexed with linezolid at 3.5 Å resolution. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 14(2), 71–75. doi: 10.1007/s10969-013-9154-x.
- Husain, F., Bikhchandani, M., & Nikaido, H. (2011). Vestibules are part of the substrate path in the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193(20), 5847–5849. doi: 10.1128/JB.05759-11.
- Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1991). More extended-spectrum β -lactamases. Section Title: *Microbial Biochemistry*, 35(9), 1697–1704. doi: 10.1128/AAC.35.9.1697.
- Janganan, T. K., Bavro, V. N., Zhang, L., Borges-Walmsley, M. I., & Walmsley, A. R. (2013). Tripartite efflux pumps: Energy is required for dissociation, but not assembly or opening of the outer membrane channel of the pump. *Molecular Microbiology*, 88(3), 590–602. doi: 10.1111/mmi.12211.

- Janganan, T. K., Bavro, V. N., Zhang, L., Matak-Vinkovic, D., Barrera, N. P., Venien-Bryan, C., ... Walmsley, A. R. (2011). Evidence for the Assembly of a Bacterial Tripartite Multidrug Pump with a Stoichiometry of 3:6:3. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26900–26912. doi: 10.1074/jbc.M111.246595.
- Jin, W., Wachino, J. I., Kimura, K., Yamada, K., & Arakawa, Y. (2014). New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1331–1337. doi: 10.1093/jac/dku537.
- Jo, J. T. H., Brinkman, F. S. L., Robert, E. W., & Hancock, R. E. W. (2003). Aminoglycoside Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of Novel Outer Membrane Proteins. *Journal of Bacteriology*, 145(3), 1101–1111. doi: 10.1128/AAC.47.3.1101.
- Johnson, J. M., & Church, G. M. (1999). Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *Journal of Molecular Biology*, 287(3), 695–715. doi: 10.1006/jmbi.1999.2630.
- Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549–1555. doi: 10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000.
- Kim, J.-S., Jeong, H., Song, S., Kim, H.-Y., Lee, K., Hyun, J., & Ha, N.-C. (2015). Structure of the Tripartite Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC Suggests an Alternative Assembly Mode. *Molecules and Cells*, 38(2), 180–6. doi: 10.14348/molcells.2015.2277.
- Knowles, T. J., Tucker, A. S., Overduin, M., & Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 7(MARCh), 206–214. doi: 10.1038/nrmicro2069.
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., & Pechère, J. (1999). Characterization of MexT, the Regulator of the MexE-MexF-OprN Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6300–6305.
- Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., & Pechère, J. C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 23(2), 345–354. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x.
- Kojima, S., & Nikaido, H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E2629–34. doi: 10.1073/pnas.1310333110.
- Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E., & Stauffer, K. (1997). Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Molecular Microbiology*, 23(3), 617–626. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.d01-1880.x.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914–9. doi: 10.1038/35016007.
- Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms140611643.

- Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E. B., Dhamdhare, G., & Zgurskaya, H. I. (2013). On the role of TolC in multidrug efflux: the function and assembly of AcrAB-TolC tolerate significant depletion of intracellular TolC protein. *Molecular Microbiology*, 87(5), 982–997. doi: 10.1111/mmi.12143.
- Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E. B., & Zgurskaya, H. I. (2008). Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: Mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 691–698. doi: 10.1128/JB.01276-07.
- Kulathila, R., Kulathila, R., Indic, M., & van den Berg, B. (2011). Crystal structure of *Escherichia coli* CusC, the outer membrane component of a heavy metal efflux pump. *PLoS ONE*, 6(1), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0015610.
- Kwon, S.-K., Kim, S. K., Lee, D.-H., & Kim, J. F. (2015). Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific Reports*, 5(October), 16076. doi: 10.1038/srep16076.
- Lamzin, V. S. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 49(Pt 1), 129–147. doi: 10.1107/S0907444992008886.
- Lamzin, V. S., & Wilson, K. S. (1997). Automated refinement for protein crystallography. *Methods in Enzymology*, 277, 269–305. doi: 10.1016/S0076-6879(97)77016-2.
- Landman, D., Bratu, S., Alam, M., & Quale, J. (2005). Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 954–957. doi: 10.1093/jac/dki153.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 449–465. doi: 10.1128/CMR.00006-08.
- Lau, C. H. F., Hughes, D., & Poole, K. (2014). MexY-promoted aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a putative proximal binding pocket in aminoglycoside recognition. *mBio*, 5(2), 1–10. doi: 10.1128/mBio.01068-14.
- Lee, J.-Y., Song, J.-H., & Ko, K. S. (2011). Identification of nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced colistin susceptibility in Korea. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 17(2), 299–304. doi: 10.1089/mdr.2010.0145.
- Lei, H. T., Chou, T. H., Su, C. C., Bolla, J. R., Kumar, N., Radhakrishnan, A., ... Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the open state of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrE outer membrane channel. *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0097475.
- Lei, H.-T., Bolla, J. R., Su, C.-C., & Yu, E. W. (2014). Crystal structures of CusC review conformational changes accompanying folding and transmembrane channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 426(2), 403–411. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.042.
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.10.001.
- Li, X. Z., Barré, N., & Poole, K. (2000). Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(6), 885–893. doi: 10.1128/JB.182.5.1410-1414.2000.
- Li, X. Z., Poole, K., & Nikaido, H. (2003). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 27–33. doi: 10.1128/AAC.47.1.27-33.2003.

- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19484–19489. doi: 10.1073/pnas.0608949103.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. doi: 10.1128/CMR.00040-09.
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C., & Plésiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5676–5684. doi: 10.1128/AAC.00101-11.
- Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M. F., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2007). A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11), 4612–4617. doi: 10.1073/pnas.0610160104.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9), 1051–1060. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01259-4.
- Maciá, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Chronic Lung Infections Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Society*, 49(8), 3382–3386. doi: 10.1128/AAC.49.8.3382.
- Mao, W., Warren, M. S., Black, D. S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., ... Lomovskaya, O. (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: The large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Molecular Microbiology*, 46(3), 889–901. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03223.x.
- Martti, V. (2010). Polymyxins and their novel derivatives. *Curr Opin Microbiol*, 13(5), 574–581. doi: 10.1016/j.mib.2010.09.002.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., & Nakae, T. (2000). Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 107–112. doi: 10.1016/S0378-1097(00)00419-5.
- Maseda, H., Yoneyama, H., & Nakae, T. (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 658–664. doi: 10.1128/AAC.44.3.658-664.2000.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., & Nishino, T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* nfxB mutant to beta-lactams due to reduced expression of the ampC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1284–6. doi: 10.1128/AAC.45.4.1284-1286.2001.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2242–2246. doi: 10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000.
- Matrat, S., Aubry, A., Mayer, C., Jarlier, V., & Cambau, E. (2008). Mutagenesis in the $\alpha 3\alpha 4$ GyrA helix and in the toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2909–2914. doi: 10.1128/AAC.01380-07.

- Matsumoto, Y., Hayama, K., Sakakihara, S., Nishino, K., Noji, H., Iino, R., & Yamaguchi, A. (2011). Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. *PLoS ONE*, 6(4), 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0018547.
- Maurer-Stroh, S., & Eisenhaber, F. (2004). Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2004.02.006.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658–674. doi: 10.1107/S0021889807021206.
- McGowan, J. E. (2006). Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. *American Journal of Infection Control*, 34(5 SUPPL.). doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.226.
- McInerney, P., Adams, P., & Hadi, M. Z. (2014). Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*, 2014, 287430. doi: 10.1155/2014/287430.
- Mech, L. D. (2014). A Gray Wolf (*Canis lupus*) Delivers Live Prey to a Pup. *Canadian Field-Naturalist*, 128(2), 189–190. doi: 10.1016/j.
- Meddows, E., Le Bourdellès, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., & McIlhinney, R. A. J. (2001). Identification of Molecular Determinants That Are Important in the Assembly of N-Methyl-D-aspartate Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18795–18803. doi: 10.1074/jbc.M101382200.
- Mesaros, N., Glupczynski, Y., Avrain, L., Caceres, N. E., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2007). A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 378–386. doi: 10.1093/jac/dkl504.
- Middlemiss, J. K., & Poole, K. (2004). Differential Impact of MexB Mutations on Substrate Selectivity of the MexAB-OprM Multidrug Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1258–1269. doi: 10.1128/JB.186.5.1258.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H. I., & Ghosh, P. (2006). Conformational Flexibility in the Multidrug Efflux System Protein AcrA. *Structure*, 14(3), 577–587.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., & Schweizer, H. P. (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7600–7609. doi: 10.1128/JB.00850-07.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289–298. doi: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- Mokhonov, V. V., Mokhonova, E. I., Akama, H., & Nakae, T. (2004). Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(2), 483–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.140.
- Mokhonova, E. I., Mokhonov, V. V., Akama, H., & Nakae, T. (2005). Forceful large-scale expression of “problematic” membrane proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(3), 650–655. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.059.

- Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M.-B., Enguéné, V. Y. N., Picard, M., & Broutin, I. (2015). New OprM structure highlighting the nature of the N-terminal anchor. *Frontiers in Microbiology*, 6(July), 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00667.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(1), 27–32. doi: 10.2323/jgam.47.27.
- Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., ... Tsuchiya, T. (2003). Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(4), 991–994. doi: 10.1093/jac/dkg173.
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4(422), 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2013.00422.
- Muller, C., Plésiat, P., & Jeannot, K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1211–1221. doi: 10.1128/AAC.01252-10.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., & Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 443(7108), 173–179. doi: 10.2142/biophys.47.309.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419(6907), 587–593. doi: 10.5940/jcrsj.45.256.
- Murakami, S., Tamura, N., Saito, A., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2004). Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3743–3748. doi: 10.1074/jbc.M308893200.
- Murata, T., Kuwagaki, M., Shin, T., Gotoh, N., & Nishino, T. (2002). The substrate specificity of tripartite efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* is determined by the RND component. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(2), 247–251. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02626-8.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., ... Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), 355–367. doi: 10.1107/S09074444911001314.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. doi: 10.1107/S09074444996012255.
- Nagakubo, S., Nishino, K., & Hirata, T. (2002). The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter. *Journal of Bacteriology*, 184-no.15(15), 4161–4167. doi: 10.1128/JB.184.15.4161.
- Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., & Nakae, T. (2000). Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30064–30068. doi: 10.1074/jbc.M005742200.

- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Hayashi, K., Nagata, C., Hoshino, K., ... Yamaguchi, A. (2013). Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature*, 500(7460), 102–6. doi: 10.1038/nature12300.
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, 480(7378), 565–9. doi: 10.1038/nature10641.
- Narita, S. I., & Tokuda, H. (2007). Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13372–13378. doi: 10.1074/jbc.M611839200.
- Nehme, D., Li, X. Z., Elliot, R., & Poole, K. (2004). Assembly of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification and Characterization of Mutations in mexA Compromising MexA Multimerization and Interaction with MexB. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2973–2983. doi: 10.1128/JB.186.10.2973-2983.2004.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of Drug Access to Bacterial Targets : Permeability Barriers and Active Efflux. *Science*, 264(5157), 382–388. doi: doi: 10.1126/science.8153625
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119–46. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- Ntsogo Enguéné, V. Y., Verchère, A., Phan, G., Broutin, I., & Picard, M. (2015). Catch me if you can: a biotinylated proteoliposome affinity assay for the investigation of assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6(June), 1–8. doi: 10.3389/fmicb.2015.00541.
- Ocaktan, A., Yoneyama, H., & Nakae, T. (1997). Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21964–21969. doi: 10.1074/jbc.272.35.21964.
- Ocampo-Sosa, A. A., Cabot, G., Rodriguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M. D., ... (REIPI), the S. N. for R. in I. D. (2012). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1703–1713. doi: 10.1128/AAC.05451-11.
- Ochs, M. M., McCusker, M. P., Bains, M., & Hancock, R. E. W. (1999). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1085–1090.
- Ohene-Agyei, T., Lea, J. D., & Venter, H. (2012). Mutations in MexB that affect the efflux of antibiotics with cytoplasmic targets. *FEMS Microbiology Letters*, 333(1), 20–27. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02594.x.
- Okuda, S., & Tokuda, H. (2011). Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 239–259. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102859.
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5(November), 643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.
- Olivares, J., Álvarez-Ortega, C., & Martínez, J. L. (2014). Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3904–3913. doi: 10.1128/AAC.00121-14.

- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 4(APR), 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2013.00103.
- Ong, C. T., Tessier, P. R., Li, C., Nightingale, C. H., & Nicolau, D. P. (2007). Comparative in vivo efficacy of meropenem, imipenem, and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* expressing MexA-MexB-OprM efflux pumps. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(2), 153–161. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.06.014.
- Overbye, K. M., & Barrett, J. F. (2005). Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discovery Today*. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03285-4.
- Pagès, J. M., Monlezun, L., Broutin, I., & Davin-Regli, A. (2011). Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2011(435), 63–72. doi: 10.1016/S1773-035X(11)71103-0
- Papanikou, E., Karamanou, S., & Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5(1740-1534 (Electronic)), 839–851. doi: 10.1038/nrmicro1771.
- Pei, X.-Y., Hinchliffe, P., Symmons, M. F., Koronakis, E., Benz, R., Hughes, C., & Koronakis, V. (2011). Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2112–2117. doi: 10.1073/pnas.1012588108.
- Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M. B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., ... Broutin, I. (2010). Structural and Dynamical Insights into the Opening Mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel. *Structure*, 18(4), 507–517. doi: 10.1016/j.str.2010.01.018.
- Phan, G., Picard, M., & Broutin, I. (2015). Focus on the Outer Membrane Factor OprM, the Forgotten Player from Efflux Pumps Assemblies. *Antibiotics*, 4(4), 544–566. doi: 10.3390/antibiotics4040544.
- Piton, J., Petrella, S., Delarue, M., André-Leroux, G., Jarlier, V., Aubry, A., & Mayer, C. (2010). Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PLoS ONE*, 5(8). doi: 10.1371/journal.pone.0012245.
- Pletzer, D., & Weingart, H. (2014). Characterization and regulation of the resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pumps MdtABC and MdtUVW from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *BMC Microbiology*, 14, 185. doi: 10.1186/1471-2180-14-185.
- Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2233–2241. doi: 10.1128/AAC.44.9.2233-2241.2000.
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(17), 2200–23. doi: 10.1007/s00018-004-4060-9.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dki171.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(65), 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2011.00065.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E., & Bianco, N. (1996). Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(9), 2021–2028.
- Pos, K. M. (2009). Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 782–793. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.12.015.

- Pos, K. M., Schiefner, A., Seeger, M. A., & Diederichs, K. (2004). Crystallographic analysis of AcrB. *FEBS Letters*, 564(3), 333–339. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00272-8.
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 568–585. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.
- Pumbwe, L., Everett, M. J., Hancock, R. E. W., & Piddock, L. J. V. (1996). Role of *gyrA* mutation and loss of *OprF* in the multiple antibiotic resistance phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* G49. *FEMS Microbiology Letters*, 143(1), 25–28. doi: 10.1016/0378-1097(96)00287-X.
- Pursell, A., & Poole, K. (2013). Functional characterization of the *NfxB* repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 10), 2058–2073. doi: 10.1099/mic.0.069286-0.
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O’Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 637–639. doi: 10.1128/AAC.02005-12.
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1451(1), 1–16. doi: 10.1016/S0167-4889(99)00075-0.
- Richardot, C., Juarez, P., Jeannot, K., Patry, I., & Plésiat, P. (2016). Amino Acid Substitutions Account for Most *MexS* Alterations in Clinical *nfxC* Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*, 60(4), 2302–2310. doi: 10.1128/AAC.02622-15.Address.
- Robbel, L., & Marahiel, M. A. (2010). Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.R110.128181.
- Robichon, C., Vidal-Ingigliardi, D., & Pugsley, A. P. (2005). Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 974–983. doi: 10.1074/jbc.M411059200.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. a, Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., ... Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88. doi: 10.1038/nm1347.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009a). Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1766–1771. doi: 10.1128/AAC.01410-08.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009b). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4783–4788. doi: 10.1128/AAC.00574-09.
- Rubin, E. J., Herrera, C. M., Crofts, A. A., & Trent, M. S. (2015). *PmrD* is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2051–2061. doi: 10.1128/AAC.05052-14.
- Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 253–267. doi: 10.1002/wsbm.1335.
- Sankaran, K., & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19701–19706.
- Schägger, H., Cramer, W. a, & von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric

- states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1006/abio.1994.1112.
- Schägger, H., & Von, J. G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1199(2), 223–31.
- Schuster, S., Vavra, M., & Kern, W. V. (2016). Evidence of a substrate discriminating entrance channel in the lower porter domain of the multidrug resistance efflux pump AcrB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (May), AAC.00314–16. doi: 10.1128/AAC.00314-16.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: Unanswered questions. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 48–62. doi: S01 [pii].
- Seeger, M. a, Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., & Pos, K. M. (2006). Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5791), 1295–1298. doi: 10.1126/science.1131542.
- Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., & Grütter, M. G. (2007). Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *PLoS Biology*, 5(1), 0106–0113. doi: 10.1371/journal.pbio.0050007.
- Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C., & Grütter, M. G. (2009). Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 389(1), 134–145. doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.001.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71–109. doi: 10.1128/CMR.00030-10.
- Slyenko, V., Schubert, M., Numao, S., Kowarik, M., Aebi, M., & Allain, F. H. T. (2009). NMR structure determination of a segmentally labeled glycoprotein using in vitro glycosylation. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3), 1274–1281. doi: 10.1021/ja808682v.
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., & Poole, K. (2005). Mutations in PA3574 (nalD) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1782–1786. doi: 10.1128/AAC.49.5.1782-1786.2005.
- Solé, M., Fàbrega, A., Cobos-Trigueros, N., Zamorano, L., Ferrer-Navarro, M., Ballesté-Delpierre, C., ... Vila, J. (2015). In vivo evolution of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients admitted to an intensive care unit: Mechanisms of resistance and antimicrobial exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(11), 3004–3013. doi: 10.1093/jac/dkv228.
- Solov'eva, T. F., Novikova, O. D., & Portnyagina, O. Y. (2012). Biogenesis of β -barrel integral proteins of bacterial outer membrane. *Biochemistry. Biokhimiia*, 77(11), 1221–36. doi: 10.1134/S0006297912110016.
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., & Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(1), 65–71.
- Staron, P., Forchhammer, K., & Maldener, I. (2014). Structure-function analysis of the ATP-driven glycolipid efflux pump DevBCA reveals complex organization with TolC/HgdD. *FEBS Letters*, 588(3), 395–400. doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.004.

- Stegmeier, J. F., Polleichtner, G., Brandes, N., Hotz, C., & Andersen, C. (2006). Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. *Biochemistry*, 45(34), 10303–10312. doi: 10.1021/bi060320g.
- Storm, D. R. (1974). Mechanism of Bacitracin Action - Specific Lipid-Peptide Interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235(MAY10), 387–398. doi: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb43278.x.
- Storz, G., Wolf, Y. I., & Ramamurthi, K. S. (2014). Small proteins can no longer be ignored. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 753–77. doi: 10.1146/annurev-biochem-070611-102400.
- Stover C-K., Pham X-Q., Erwin A-L., Mizoguchi S-D., Warrenner P., H. M.-J., & Brinkman F-S., Hufnagle W-O., Kowalik D-J., Lagrou M. Garber R-L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L-L., Coulter S-N., Folger K-R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G-K., Wu Z., Paulsen I-T., Reizer J., Sa, O. M.-V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. doi: 10.1038/35023079.
- Su, C. C., Long, F., Zimmermann, M. T., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., & Yu, E. W. (2011). Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature*, 470(7335), 558–562. doi: 10.1038/nature09743.
- Su, C. C., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., Bolla, J. R., Lei, H. T., ... Yu, E. W. (2014). Crystal structure of the *Campylobacter jejuni* CmeC outer membrane channel. *Protein Science*, 23(7), 954–961. doi: 10.1002/pro.2478.
- Su, C. C., Yang, F., Long, F., Reyon, D., Routh, M. D., Kuo, D. W., ... Yu, E. W. (2009). Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 393(2), 342–355. doi: 10.1016/j.jmb.2009.08.029.
- Su, C., Long, F., Zimmermann, M. T., Kanagalaghatta, R., Jernigan, R. L., & Yu, E. W. (2011). Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature*, 470(7335), 558–562. doi: 10.1038/nature09743.Crystal.
- Su, C.-C., Long, F., Lei, H.-T., Bolla, J. R., Do, S. V., & Yu, K. R. R. E. W. (2012). Charged amino acids (R83, E567, D617, E625, R669 and K678) of CusA are required for metal-ion transport in the Cus efflux system. *Journal of Microbiology*, 422(3), 429–441. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.038.Charged.
- Su, C.-C., Nikaido, H., & Yu, E. W. (2007). Ligand-transporter interaction in the AcrB multidrug efflux pump determined by fluorescence polarization assay. *FEBS Letters*, 581(25), 4972–4976. doi: 10.1126/scisignal.2001449.Engineering.
- Subramanian Krishnan, N. V. P. (2012). Outer membrane protein A and OprF – Versatile roles in Gramnegative bacterial infections. *Febs Journal*, 279(6), 919–931. doi: 10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.
- Sugawara, E., Nagano, K., & Nikaido, H. (2012). Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Journal*. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08481.x
- Swamy, M., Kulathu, Y., Ernst, S., Reth, M., & Schamel, W. W. A. (2006). Two dimensional Blue Native-/SDS-PAGE analysis of SLP family adaptor protein complexes. *Immunology Letters*, 104(1-2), 131–137. doi: 10.1016/j.imlet.2005.11.004.
- Swamy, M., Minguet, S., Siegers, G. M., Alarcon, B., & Schamel, W. W. A. (2007). A native antibody-based mobility-shift technique (NAMOS-assay) to determine the stoichiometry of multiprotein complexes. *Journal of Immunological Methods*, 324(1-2), 74–83. doi: 10.1016/j.jim.2007.05.003.

- Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(17), 7173–7178. doi: 10.1073/pnas.0900693106.
- Symmons, M. F., Marshall, R. L., & Bavro, V. N. (2015). Architecture and roles of periplasmic adaptor proteins in tripartite efflux assemblies. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–20. doi: 10.3389/fmicb.2015.00513.
- Tabata, A., Nagamune, H., Maeda, T., Murakami, K., Miyake, Y., & Kourai, H. (2003). Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2093–2099. doi: 10.1128/AAC.47.7.2093.
- Takatsuka, Y., & Nikaido, H. (2009). Covalently linked trimer of the AcrB multidrug efflux pump provides support for the functional rotating mechanism. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1729–1737. doi: 10.1128/JB.01441-08.
- Tamber, S., & Hancock, R. E. W. (2003). On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 8, s472–83.
- Tamura, N., Murakami, S., Oyama, Y., Ishiguro, M., & Yamaguchi, A. (2005). Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 44(33), 11115–11121. doi: 10.1021/bi050452u.
- Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S. I., & Tokuda, H. (2001). Lipoprotein Sorting Signals Evaluated as the LolA-dependent Release of Lipoproteins from the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47690–47694. doi: 10.1074/jbc.M109307200.
- Tikhonova, E. B., Wang, Q., & Zgurskaya, H. I. (2002). Chimeric Analysis of the Multicomponent Multidrug Efflux Transporters from Gram-Negative Bacteria. *Society*, 184(23), 6499–6507. doi: 10.1128/JB.184.23.6499.
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., & Zgurskaya, H. I. (2011). Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chemistry and Biology*, 18(4), 454–463. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.02.011.
- Tikhonova, E. B., & Zgurskaya, H. I. (2004). AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32116–32124. doi: 10.1074/jbc.M402230200.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular Microbiology*, 53(2), 697–706. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular Microbiology*, 53(2), 697–706. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x.
- Tran, Q. T., Dupont, M., Lavigne, J. P., Phevalier, J., Pages, J. M., Sotto, A., & Davin-Regli, A. (2009). Occurrence of efflux mechanism and cephalosporinase variant in a population of enterobacter aerogenes and klebsiella pneumoniae isolates producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1652–1656. doi: 10.1128/AAC.00822-08.
- Trépot, S., Taveau, J.-C., Benabdelhak, H., Granier, T., Ducruix, A., Frangakis, A. S., & Lambert, O. (2010). Structure of reconstituted bacterial membrane efflux pump by cryo-electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(10), 1953–1960. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.019.
- Trias, J., & Nikaido, H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of

- carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(1), 52–57. doi: 10.1128/AAC.34.1.52.
- Trias, J., & Nikaido, H. (1990). Protein D2 Channel of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Has a Binding Site for Basic Amino Acids and Peptides *. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 265(26), 15680–15684.
- Trouillet, J. L., Vuagnat, a, Combes, a, Kassis, N., Chastre, J., & Gibert, C. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due to piperacillin-resistant versus piperacillin-susceptible organisms. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(8), 1047–54. doi: 10.1086/339488.
- Tschumi, A., Nai, C., Auchli, Y., Hunziker, P., Gehrig, P., Keller, P., ... Sander, P. (2009). Identification of apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27146–27156. doi: 10.1074/jbc.M109.022715.
- Tsuchido, T., & Takano, M. (1988). Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), 1680–1683.
- Vargiu, A. V., & Nikaido, H. (2012). Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20637–20642. doi: 10.1073/pnas.1218348109.
- Vargiu, A. V., Ruggerone, P., Opperman, T. J., Nguyen, S. T., & Nikaido, H. (2014). Inhibition of *E. coli* AcrB multidrug efflux pump by MBX2319: molecular mechanism and comparison with other inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), AAC.03283–14. doi: 10.1128/AAC.03283-14.
- Vediyappan, G., Borisova, T., & Fralick, J. A. (2006). Isolation and characterization of VceC gain-of-function mutants that can function with the AcrAB multiple-drug-resistant efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3757–3762. doi: 10.1128/JB.00038-06.
- Veesler, D., Blangy, S., Cambillau, C., & Sciara, G. (2008). There is a baby in the bath water: AcrB contamination is a major problem in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 64(10), 880–885. doi: 10.1107/S1744309108028248.
- Verchère, A., Broutin, I., & Picard, M. (2013). Hoechst likes to play hide and seek ... use it with caution! *Analytical Biochemistry*, 440(2), 117–119. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.019.
- Verchère, A., Dezi, M., Adrien, V., Broutin, I., & Picard, M. (2015). In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 6, 6890. doi: 10.1038/ncomms7890.
- Verchère, A., Dezi, M., Broutin, I., & Picard, M. (2014). In vitro investigation of the MexAB efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (84), e50894. doi: 10.3791/50894.
- Visalli, M. A., Murphy, E., Projan, S. J., & Bradford, P. A. (2003). AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 665–669. doi: 10.1128/AAC.47.2.665-669.2003.
- Vogne, C., Aires, J. R., Bailly, C., Hocquet, D., & Plésiat, P. (2004). Role of the Multidrug Efflux System MexXY in the Emergence of Moderate Resistance to Aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

- 48(5), 1676–1680. doi: 10.1128/AAC.48.5.1676-1680.2004.
- Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: A global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 3), S8–S14. doi: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
- Wang, B., Weng, J., & Wang, W. (2015). Substrate binding accelerates the conformational transitions and substrate dissociation in multidrug efflux transporter AcrB. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2015.00302.
- Weeks, J. W., Bavro, V. N., & Misra, R. (2014). Genetic assessment of the role of AcrB β -hairpins in the assembly of the TolC-AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 91(5), 965–975. doi: 10.1111/mmi.12508.
- Weeks, J. W., Nickels, L. M., Ntrel, A. T., & Zgurskaya, H. I. (2015). Non-equivalent roles of two periplasmic subunits in the function and assembly of triclosan pump TriABC from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 98(2), 343–356. doi: 10.1111/mmi.13124.
- Wehmeier, C., Schuster, S., Fährnich, E., Kern, W. V., & Bohnert, J. A. (2009). Site-directed mutagenesis reveals amino acid residues in the *Escherichia coli* RND efflux pump AcrB that confer macrolide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 329–330. doi: 10.1128/AAC.00921-08.
- Welch, A., Awah, C. U., Jing, S., van Veen, H. W., & Venter, H. (2010). Promiscuous partnering and independent activity of MexB, the multidrug transporter protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Biochemical Journal*, 430(2), 355–364. doi: 10.1042/BJ20091860.
- West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K., & Runyen-Janecky, L. J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 148(1), 81–86. doi: 10.1016/0378-1119(94)90237-2.
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 35–48. doi: 10.1038/nrmicro3155.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., ... Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. doi: 10.1107/S0907444910045749.
- Wong, M. H. Y., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2015). Evolution and Dissemination of OqxAB-Like Efflux Pumps, an Emerging Quinolone Resistance Determinant among Members of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3290–3297. doi: 10.1128/AAC.00310-15.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5(1740-1534 (Electronic)), 175–186. doi: 10.1038/nrmicro1614
- Wright, G. D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications*, 47(14), 4055. doi: 10.1039/c0cc05111j.
- Xia, J., Gao, J., & Tang, W. (2016). Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *BioScience Trends*, 10(1), 14–21. doi: 10.5582/bst.2016.01020.
- Xu, Y., Lee, M., Moeller, A., Song, S., Yoon, B.-Y., Kim, H.-M., ... Ha, N.-C. (2011). Funnel-like Hexameric Assembly of the Periplasmic Adapter Protein in the Tripartite Multidrug Efflux Pump in Gram-negative Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17910–17920. doi: 10.1074/jbc.M111.238535.
- Xu, Y., Moeller, A., Jun, S.-Y., Le, M., Yoon, B.-Y., Kim, J.-S., ... Ha, N.-C. (2012). Assembly and Channel Opening of Outer Membrane Protein in Tripartite Drug Efflux Pumps of Gram-negative Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11740–11750. doi: 10.1074/jbc.M111.329375.

- Yamaguchi, A., Nakashima, R., & Sakurai, K. (2015). Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2015.00327.
- Yamanaka, H., Nomura, T., Morisada, N., Shinoda, S., & Okamoto, K. (2002). Site-directed mutagenesis studies of the amino acid residue at position 412 of *Escherichia coli* TolC which is required for the activity. *Microbial Pathogenesis*, 33(2), 81–89. doi: 10.1006/mpat.2002.0519.
- Yamane, K., Doi, Y., Yokoyama, K., Kurokawa, H., Shibata, N., & Yagi, T. (2004). Genetic Environments of the *rmtA* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2069–2074. doi: 10.1128/AAC.48.6.2069.
- Yamano, Y., Nishikawa, T., & Komatsu, Y. (1990). Outer membrane proteins responsible for the penetration of beta-lactams and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 26(2), 175–184.
- Yao, X. Q., Kimura, N., Murakami, S., & Takada, S. (2013). Drug uptake pathways of multidrug transporter AcrB studied by molecular simulations and site-directed mutagenesis experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20), 7474–7485. doi: 10.1021/ja310548h.
- Yonehara, R., Yamashita, E., & Nakagawa, A. (2016). Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, DOI 10.100(October 2015), 1. doi: 10.1002/prot.25022.
- Yoneyama, H., Ocaktan, A., Gotoh, N., Nishino, T., & Nakae, T. (1998). Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(3), 898–902. doi: 10.1006/bbrc.1998.8351.
- Yu, E. W. (2003). Structural Basis of Multiple Drug-Binding Capacity of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *Science*, 300(5621), 976–980. doi: 10.1126/science.1083137.
- Yu, E. W., Aires, J. R., McDermott, G., & Nikaido, H. (2005). A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: A crystallographic and site-directed mutagenesis study. *Journal of Bacteriology*, 187(19), 6804–6815. doi: 10.1128/JB.187.19.6804-6815.2005.
- Yu, E. W., Aires, J. R., & Nikaido, H. (2003). AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: Composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5657–5664. doi: 10.1128/JB.185.19.5657-5664.2003.
- Yu, E. W., McDermott, G., Zgurskaya, H. I., Nikaido, H., & Koshland Jr., D. E. (2003). Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science*, 300(5621), 976–980. doi: 10.1126/science.1083137.
- Yum, S., Xu, Y., Piao, S., Sim, S. H., Kim, H. M., Jo, W. S., ... Ha, N. C. (2009). Crystal Structure of the Periplasmic Component of a Tripartite Macrolide-Specific Efflux Pump. *Journal of Molecular Biology*, 387(5), 1286–1297. doi: 10.1016/j.jmb.2009.02.048.
- Zgurskaya, H. I., Weeks, J. W., Ntrel, A. T., Nickels, L. M., & Wolloscheck, D. (2015). Mechanism of coupling drug transport reactions located in two different membranes. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.00100.
- Zgurskaya, H. I., Yamada, Y., Tikhonova, E. B., Ge, Q., & Krishnamoorthy, G. (2009). Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 794–807. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.10.010.
- Ziervogel, B. K., & Roux, B. (2013). The binding of antibiotics in OmpF porin. *Structure*, 21(1), 76–87. doi: 10.1016/j.str.2012.10.014.

Résumé

Les pompes d'efflux sont des complexes macromoléculaires qui permettent l'efflux des antibiotiques à travers les deux membranes (interne et externe). Ces pompes, spécifiques des bactéries Gram négatif, constituent l'un des acteurs majeurs du phénomène de résistance aux antibiotiques, en contribuant ainsi à la résistance intrinsèque et acquise de ces bactéries à de nombreuses molécules utilisées en antibiothérapie. Chez *P. aeruginosa*, ces pompes appartiennent pour la plupart à la famille des transporteurs RND. Ce sont des complexes tripartites constitués d'un transporteur de la membrane interne (RND), d'un adaptateur périplasmique (MFP) et d'un canal de la membrane externe (OMF). Ces composants ont été caractérisés individuellement chez de nombreuses bactéries. Cependant, les mécanismes qui régissent l'assemblage et la dissociation de la pompe, essentiels pour son fonctionnement, demeurent mal compris. Nous nous sommes donc intéressés au cours de ce travail aux pompes à efflux de *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons notamment procédé à la caractérisation structurale du canal OprN de la pompe MexEF-OprN impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones et à la caractérisation biophysique du transporteur RND MexY de la pompe MexXYOprM, spécifique des aminoglycosides. Nous avons étudié en parallèle le mécanisme d'ouverture du canal OprM seul in vitro (aspects structuraux) et in vivo (aspects fonctionnels) au sein de la pompe assemblée. Nos résultats montrent que les OMFs de *P. aeruginosa* présentent des similitudes avec les OMFs d'autres bactéries Gram négatif, mais également des différences, notamment pour OprN et OprM au niveau de l'interaction avec leurs partenaires ou encore pour OprM concernant l'ouverture du canal. Nous avons par ailleurs participé à l'étude in vitro de l'assemblage et du transport à travers la pompe MexAB-OprM, reconstituée au sein de protéoliposomes, confirmant l'importance de l'acylation de la MFP dans la formation du complexe et montrant l'importance de la force proto-motrice dans l'assemblage de la pompe mais pas dans sa dissociation. En parallèle de l'étude des pompes à efflux, nous nous sommes intéressés à un autre système de résistance, impliqué dans la dégradation des antibiotiques. Nous avons donc réalisé, en collaboration avec le Pr Patrick Plésiat (laboratoire de Bactériologie de Besançon), la modélisation de mutants de la beta-lactamase AmpC de *P. aeruginosa*, permettant de lier les effets fonctionnels observés à des hypothèses de modifications conformationnelles.