



**HAL**  
open science

# Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Dimitri Salvador

► **To cite this version:**

Dimitri Salvador. Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0417 . tel-03084253

**HAL Id: tel-03084253**

**<https://theses.hal.science/tel-03084253>**

Submitted on 21 Dec 2020

**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.

Mémoire de Thèse de Doctorat présenté en vue de l'obtention du grade  
de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

**Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien  
MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez  
*Pseudomonas aeruginosa*.**

**Dimitri Salvador**

Soutenue le 20 Décembre 2018

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, spécialité biochimie

**Membres du jury**

Mme Isabel Alves	Directrice de recherche – CNRS	Présidente du jury
Mme Isabelle Mus-Veteau	Directrice de recherche – CNRS	Rapporteur
M. Alain Roussel	Directeur de recherche – CNRS	Rapporteur
Mme Corinne Lionne	Directrice de recherche – CNRS	Examineur
M. Pierre Falson	Directeur de recherche – CNRS	Examineur
M. Olivier Lambert	Directeur de recherche – CNRS	Directeur de Thèse





À ma mère, à mon père, qui ont chacun contribué pour partie à la genèse de l'esprit scientifique qui est le mien ; par l'intelligence et le pragmatisme que j'ai tirés de l'un, et la capacité d'abstraction que j'ai prélevée chez l'autre. Les chats, en définitive, ne font pas des chiens.

« L'hypothèse devient connaissance, et la connaissance humaine gardera toujours une somme d'invérification où pourront s'insérer des amorces de connaissance nouvelles. Ainsi nous sera-t-il donné d'instituer, de jour en jour, de fragiles abris de compréhension qui iront se consolidant à toute heure, et nous permettront de nous accommoder progressivement au monde, au lieu de nous affoler lorsque le monde ne s'ajuste pas à l'obscurité des méconnaissances ancestrales où notre torpeur intellectuelle trouve tant de charme à s'effondrer. [...] **Ce sont les jeunes que nous appelons les anciens, écrivait Roger Bacon. Les primitifs, qualifiés par nous de vieux, ne peuvent nous offrir qu'une autorité d'ignorance, tandis que nous, modernes, chargés d'ancienneté, représentons tout un passé d'évolutions.** [...] Nos erreurs d'improvisations interprétatives appelleront le contrôle d'une observation vérifiée pour essayer de distinguer, peu à peu, ce qui paraît être de ce qui est. [...] Rêver au lieu d'essayer de connaître, au lieu de penser, c'est la voie féerique qui s'ouvre aux esprits fatigués de l'effort avant de s'être efforcés. [...] Devant nous, à tout moment, l'inconnu se dérobe pas à pas. Nous n'atteindrons pas « l'ultime raison des choses », s'il existe rien qui se puisse dénommer ainsi. Nous n'en marcherons pas moins bravement à la conquête de nous-mêmes et du monde, sans attendre de notre marche à l'étoile une autre récompense que le contentement d'avoir marché. Vienne l'événement qui rompra notre journée, nous aurons vécu d'un éclair de noblesse humaine sans parallèle dans les mornes sphères de la Divinité. Combien de Dieux, qui n'auront connu que la peine de naître, seraient dignes, à ce compte, de l'humanité ? [...] Que dire des méprises où l'imagination sans contrôle nous a fait tomber ? L'expérience contrôlera l'expérience, avec ou sans le secours de l'imagination qui a si souvent besoin d'être étayée. Quant à vouloir vérifier l'expérience par des rencontres d'imagination, c'est une entreprise où l'histoire des religions ne nous induira pas à persévérer. [...] **C'est le constant aspect du chantier de la connaissance humaine depuis qu'elle est instituée, et cela ne changera pas. Nous savons bien, nous savons mal, ou nous ne savons pas, et nous savons insuffisamment ce que nous savons le mieux. Surtout, nous ne pouvons distinguer, entre ces catégories, qu'avec l'expérience du temps.** »

Georges Clemenceau, *Au soir de la pensée*, Tome premier, 1927.

« Le hasard pur, [...] liberté absolue mais aveugle, à la racine même du prodigieux édifice de l'évolution : cette notion centrale de la biologie moderne n'est plus aujourd'hui une hypothèse, parmi d'autres possibles ou moins concevables. Elle est la seule concevable [...]. Et rien ne permet de supposer (ou d'espérer) que nos conceptions sur ce point devront ou même pourront être révisées. [...] Le danger, pour l'espèce [humaine], des conditions de non sélection, ou de sélection à rebours, qui règnent dans les sociétés avancées, est certain. Il ne pourrait cependant devenir très sérieux qu'à longue échéance : disons dix ou quinze générations, plusieurs siècles. Or, les sociétés modernes sont exposées à des menaces autrement pesantes et graves. [...] **Les sociétés modernes ont accepté les richesses et les pouvoirs que la science leur découvrait. Mais elles n'ont pas accepté, à peine ont-elles entendu, le plus profond message de la science : la définition d'une nouvelle et unique source de vérité [...].** Armées de tous les pouvoirs, jouissant de toutes les richesses qu'elles doivent à la Science, nos sociétés tentent encore de vivre et d'enseigner des systèmes de valeurs déjà ruinés, à la racine, par cette science même. »

Jacques Monod, *Le hasard et la nécessité*, 1970.

« Tout organisme, quel qu'il soit, se trouve alors indissolublement lié, non seulement à l'espace qui l'entoure, mais encore au temps qui l'a conduit là [...]. Par sa régularité, [la reproduction] fait naître l'enfant semblable aux parents. Par ses fluctuations, elle crée des nouveautés. **Modifiés ou non, les êtres naissent. Après quoi, ils sont jugés. Jugés par le pays où ils vivent et les êtres qui les entourent; par ceux qu'ils chassent et ceux qui les chassent; par ceux de leur sexe et ceux de l'autre. Et le verdict est sans appel. Il se mesure au nombre des descendants.**

[...] Qu'on analyse donc les fonctions de notre cellule bactérienne, sa morphologie ou son intégration, **c'est toujours la famille des protéines qui occupe la première place.** »

François Jacob, *La logique du vivant*, 1970.

**Titre :** Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

## Résumé

L'utilisation croissante de traitements antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes a favorisé l'émergence de souches résistantes et multi-résistantes. Celles-ci présentent un danger sanitaire à l'échelle mondiale, la découverte et la production de nouvelles molécules antibiotiques ayant ralenti tandis que les événements médicaux impliquant des souches résistantes ont augmenté. Mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'émergence et le maintien de la résistance aux antibiotiques est crucial pour l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers disposent notamment d'un système actif d'efflux des drogues par le biais de pompes à efflux. Les transporteurs protéiques qui les composent disposent d'affinité pour un large spectre de molécules de nature et de structures chimiques différentes de sorte qu'un nombre limité de ces transporteurs suffisent à extruder hors de la cellule la majorité des molécules xénobiotiques qu'elle rencontre. De ce fait, la concentration intracellulaire en antibiotique reste faible ce qui limite ou inhibe leur effet. Ces pompes à efflux sont donc des cibles privilégiées.

Cette thèse propose une étude structurale d'une pompe à efflux particulière, MexAB-OprM, exprimée de manière constitutive chez *P. aeruginosa* et surexprimée chez les cas cliniques de résistance aux antibiotiques. Ce complexe tripartite traverse l'enveloppe bactérienne et se compose d'un transporteur MexB, situé dans la membrane interne de la bactérie et qui utilise l'énergie du gradient de protons pour son activité d'efflux, d'une protéine canal OprM insérée

dans la membrane externe et d'une protéine adaptateur MexA qui fait le lien entre les deux précédentes et insérée dans la membrane interne par une ancre lipidique. Les structures cristallographiques de chaque partenaire sont connues mais la structure de l'assemblage tripartite reste à déterminer.

La stabilisation des différents partenaires du complexe tripartite au moyen de nanodisques, qui permettent d'insérer une protéine membranaire d'intérêt dans une bicouche lipidique discoïdale délimitée par une protéine amphiphile d'échafaudage dérivée de l'apolipoprotéine A1, la MSP, ont rendu possible l'étude structurale du complexe tripartite assemblé spontanément *in vitro* par ajout de MexA en détergent aux protéines OprM et MexB reconstituées en nanodisques. L'optimisation des conditions de production du complexe tripartite a permis de cribler les différents paramètres régissant l'assemblage du complexe et de le purifier pour étude structurale par cryo-ME.

Cette étude structurale a produit une carte de densité électronique avec une résolution inférieure à 4 Å permettant la construction d'un modèle atomique de la pompe à efflux entière réalisée à partir de protéines natives. Celle-ci révèle un complexe de 30 nm de long. La présence d'un hexamère de MexA en continuité directe du trimère de OprM et en interaction avec le transporteur trimérique MexB via ses domaines Membrane Proximal et tonneau  $\beta$  permet la jonction entre ces deux protéines au travers d'un tube étanche. Le canal formé par OprM est maintenu ouvert par interaction bout-à-bout avec les structures en tige boucle des protéines MexA. La conformation du complexe représente un état de repos, prêt à l'efflux.

L'étude de la stabilisation des protéines membranaires par les nanodisques a conduit au développement d'un système minimal, débarrassé des lipides. Celui-ci utilise la capacité de la



MSP à s'organiser spontanément autour des segments transmembranaires hydrophobes d'une protéine d'intérêt lors du retrait du détergent qui la stabilise. L'utilisation de ce système nanodisque minimal pour la reconstitution des protéines MexB et OprM, a révélé la nécessité de la présence d'une phase lipidique autour du transporteur MexB pour autoriser l'ancrage de la protéine MexA et la formation d'un complexe tripartite.

### **Mots-clés**

Système tripartite d'efflux, MexAB-OprM, résistance aux antibiotiques, stabilisation protéines membranaires, nanodisques

### **Unité de recherche**

Chimie Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN), CNRS UMR 5248, Allée Geoffroy  
Saint Hilaire Bât B14 33600 Pessac

**Titre :** Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Résumé**

L'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes a favorisé l'émergence de souches résistantes. Comprendre les mécanismes de résistance est crucial pour lutter contre ces pathogènes. Cette thèse propose une étude structurale d'une pompe à efflux multidrogues de *Pseudomonas aeruginosa* qui se compose d'un transporteur MexB, d'une protéine canal OprM et d'une protéine adaptateur MexA. Les partenaires du complexe tripartite stabilisés en nanodisques ont permis la formation du complexe *in vitro*. L'optimisation des conditions de production du complexe a permis de cribler les différents paramètres régissant son assemblage. L'étude structurale par cryo-ME révèle un complexe de 30 nm de long en conformation de repos. L'étude de la stabilisation des protéines membranaires par nanodisques a conduit au développement d'un système minimal, débarrassé des lipides. Ce système minimal a révélé la nécessité d'une phase lipidique autour de MexB pour l'assemblage du complexe.

## **Mots-clés**

Système tripartite d'efflux, MexAB-OprM, résistance aux antibiotiques, stabilisation protéines membranaires, nanodisques

**Title :** Structural study of a bacterial tripartite efflux pump system, MexAB-OprM, involved in antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Abstract**

The increasing use of antibiotic treatments against bacterial infections has promoted the emergence of resistant and multi-resistant strains of bacteria. These are responsible for a worldwide health crisis. Indeed, research and development into new antibiotic molecules efficient against resistant bacteria has stalled in recent decades. Worse, the last line of defense antibiotics are also starting to incite resistance even though their use is strictly regulated. A better understanding of the mechanisms underlying the emergence and maintenance of antibiotic resistance is critical to the development of new strategies to fight bacterial pathogens like *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria possess an active efflux system made of transporter proteins that exhibit affinities towards a large spectrum of molecules different in nature and chemical structures. This allows a limited number of transporters to extrude almost any xenobiotic compound out of the cell where it cannot accumulate to the threshold concentration required to trigger its cytotoxic effect. Efflux pumps are therefore a relevant target for innovative inhibitory compounds.

This thesis is concerned with the structural study of a constitutively expressed efflux pump in *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, which is overexpressed in clinical isolates of resistant strains. This tripartite complex spans the bacterial envelope through the periplasm, inner and outer membrane. The transporter, MexB, is inserted into the inner membrane and uses the energy stored within the proton gradient to drive the efflux of drugs out of the cell. A canal protein, OprM, is inserted into the outer membrane and form an exit duct for extruded molecules. Finally, an adaptor protein MexA is anchored to the inner membrane by a palmitoyl post-

translational modification and bridges the two other partners. Even though the crystallographic structures of each protein is known, that of the pump is still lacking.

In order to study the complex by cryo electron microscopy, the protein were reconstituted into nanodiscs which allow a membrane protein to be inserted into a discoidal lipidic bilayer constrained by an amphiphilic protein derived from the apolipoprotein A1, the MSP (Membrane Scaffold Protein). Adding pure MexA in detergent to a solution of MexB and OprM in nanodiscs allowed spontaneous complex assembly *in vitro*. Optimization of tripartite complex yield was undertaken to achieve sufficient quantities to enable cryo-EM study after complex purification. This work identified key parameters governing tripartite complex formation. This structural study allowed the calculation of an electronic 3D map with a resolution below 4 Å and the subsequent construction of an atomic model for the whole pump reconstituted in nanodiscs with native proteins. The model shows an hexameric MexA interacting through its helix hairpins in a tip-to-tip fashion with OprM in open conformation. MexA also interacts with MexB with its Membrane Proximal and  $\beta$  barrel domains. The pump is a 30 nm long complex, in a resting state, ready to start the efflux of drugs and is reminiscent of structures determined for homolog complexes in *E. coli*.

The study of membrane protein stabilisation by nanodiscs has led to the development of a minimal system devoid of lipids which makes use of the spontaneous association of MSP with the hydrophobic segments of a membrane protein upon detergent removal to form nanoparticules amenable to structural studies. Moreover, stabilization of OprM and MexB by this minimal nanodisc tool revealed the necessity of lipids for MexA anchoring to MexB and tripartite complex formation.

This thesis work is a first step towards a better structural knowledge of the tripartite MexAB-OprM in order to develop specific inhibitors of the assembly. Moreover, the minimal nanodisc system is a new versatile tool allowing stabilisation of membrane proteins with or without lipids by a single system.

**Keywords :**

Tripartite efflux system, MexAB-OprM, antibiotic resistance, membrane protein stabilization, nanodiscs

**Title :** Structural study of a bacterial tripartite efflux pump system, MexAB-OprM, involved in antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Abstract**

Antibiotics use against bacterial infections has led to the emergence of resistance. Understanding the mechanisms underlying resistance to antibiotics is critical to fight against these pathogens. This thesis presents a structural study of a multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*, composed of a transporter MexB, an exit duct OprM and an adaptor protein MexA. The proteins reconstituted in nanodiscs allowed tripartite complex formation *in vitro*. Optimization of yield led to the identification of key parameters governing complex assembly. Structural cryo-EM study revealed a 30 nm long complex in a resting state. The study of membrane protein stabilization by nanodisks led to the development of a minimal system devoid of lipids. This system showed a lipid phase around MexB is required for complex formation.

## **Keywords :**

Tripartite efflux system, MexAB-OprM, antibiotic resistance, membrane protein stabilization, nanodiscs

## Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Les rapporteurs tout d'abord ; Mme Isabelle Mus-Veteau et M. Alain Roussel, mais aussi les examinateurs ; Mme Corinne Lionne, Mme Isabel Alves, et enfin M. Pierre Falson. Merci pour le temps et l'attention que vous aurez porté à ce manuscrit.

Je tiens évidemment à remercier Olivier Lambert, directeur de cette thèse, pour la qualité de son encadrement durant ces trois ans, la confiance qu'il m'a témoigné et les remarques toujours pertinentes et constructives qu'il a émises à l'endroit de ce travail de thèse. Je veux par ailleurs souligner la patience qui aura été la sienne pour la relecture de ce mémoire de thèse, dont le temps que j'aurai pris à le rédiger n'aura pas facilité sa tâche. Enfin, j'ai particulièrement apprécié sa disponibilité et les nombreuses discussions, parfois longues à l'excès mais toujours passionnantes, concernant les différents aspects théoriques et généraux de la thématique.

Présent au laboratoire depuis mon stage de Master 2, je veux ici exprimer toute la gratitude qui est la mienne pour Laetitia Daury, qui fut mon encadrante pendant ce stage et qui m'aura épaulée à la paillasse au cours de cette thèse. Son aide fut aussi précieuse pour la gestion des aspects administratifs. C'est un peu sa faute si j'ai attrapé le virus des pompes à efflux.

Un merci chaleureux à l'ensemble des membres de l'équipe, à la fois pour l'aide et la gentillesse dont ils auront fait preuve, Marie-Christine Gerbod-Giannone, Sylvie Poussard, Elise Dargelos et Jean-Christophe Taveau. Un merci tout particulier à Marion Decossas dont la bienveillance et la mansuétude n'ont d'égal que la formation de grande qualité à la

microscopie électronique qu'elle m'avait prodiguée. Je remercie aussi Isabel Alves, toujours enthousiaste et disponible malgré les nombreuses sollicitations à son endroit, qui m'a permis de réaliser des expériences de PWR. À ce titre je salue l'expertise de Étienne Haarte qu'il aura essayé de me transmettre pour partie. Je tiens encore à souligner le dévouement et l'amabilité de Céline Gounou, dont j'ai parfois emprunté les équipements et souvent accaparé le temps précieux. Son aide aura rendu possibles les expériences de QCM-D et de purification des protéines. Enfin je veux remercier la main-forte et la bonne humeur apportées par notre présidente, Sophie Lecomte, notamment concernant les expériences d'ATR-FTIR. J'étends bien entendu ces remerciements sincères au reste du personnel de CBMN que j'ai côtoyé pendant ces trois ans pour leur sympathie.

Je remercie également les collaborateurs : Isabelle Broutin, Gilles Phan et Cyril Garnier pour la production des protéines membranaires, notamment MexAB-OprM, et leur accueil chaleureux en ces fraîches journées d'hiver où je m'étais déplacé à la capitale pour suivre leur enseignement ; Vincent Postis qui m'a permis de venir dans son laboratoire me former à la purification de protéines membranaires par la méthode SMA et le stock généreux de polymère qu'il nous a octroyé, ainsi que Mayuri Patel qui m'a supporté pendant cette semaine de formation ; Alain Roussel grâce à qui les expériences de Thermophorèse ont pu être menées à bien et Maria Mate pour son amabilité et sa disponibilité lorsque je l'avais dérangée deux jours durant, m'étant déplacé à Marseille pour des manip de thermophorèse ; enfin Martin Picard à qui je dois l'utilisation des BAPOLs et SAPOLs, par ailleurs toujours affable et sympathique.



Sur un plan plus personnel, je veux remercier celles avec qui j'aurai partagé les galères et les bons moments de cette thèse, Marie et Laurence, merci pour tout, je sais que vous savez, nul besoin de grands mots ni de longs discours. Je n'oublie pas non plus les collègues de l'open space : Cécile, Ghita, Lucie, Narek, et les quelques stagiaires que j'aurai appréciées : Lisa et Camille. Enfin, j'ai une petite pensée amusée, sachant ce qui l'attend, à celle qui me succède, bon courage Esther!

Je veux, pour finir, remercier ma famille qui m'a toujours soutenu, et en particulier mes parents qui ont rendu cette aventure possible.



## Table des matières

<b><u>Remerciements</u></b> .....	<b>14</b>
<b><u>Avant-propos</u></b> .....	<b>22</b>
<b><u>Chapitre I :</u></b>	
<b><u>Résistance aux antibiotiques :</u></b>	
<b><u>un problème croissant de santé publique</u></b> .....	<b>26</b>
A) <u>Mécanismes de résistance</u> .....	31
B) <u>Pompes à efflux tripartites AcrAB-TolC et MexAB-OprM</u> .....	36
B.1 <u>Structures des transporteurs RND AcrB et MexB</u> .....	37
B.2 <u>Structure des protéines canal TolC et OprM</u> .....	44
B.3 <u>Structures des protéines adaptateur périplasmique PAP, MexA et AcrA</u> .....	46
B.4 <u>Mécanisme d'efflux des pompes RND et spécificité de substrat</u> .....	49
B.5 <u>Assemblage du complexe tripartite</u> .....	57
B.6 <u>Désassemblage du complexe tripartite</u> .....	70
C) <u>Stabilisation des protéines membranaires</u> .....	72
C.1 <u>Détergents</u> .....	72
C.2 <u>Liposomes</u> .....	77
C.3 <u>Nanodisques</u> .....	80
C.4 <u>Polymères synthétiques</u> .....	83
C.4.1 <u>Amphipols</u> .....	83
C.4.2 <u>Copolymère d'Acide Styène Maléique (SMA)</u> .....	86
<b><u>Chapitre 2 :</u></b>	
<b><u>Reconstitution du transporteur RND et de la protéine canal OMF en nanodisque et assemblage tripartite</u></b> .....	<b>90</b>
A) <u>Production des protéines échafaudage membranaire MSP1D1 et MSP1E3D1</u> .....	91
B) <u>Reconstitution de Mexb et OprM en nanodisques</u> .....	93
C) <u>Reconstitution de nanodisques MexAB</u> .....	99
D) <u>Assemblage du complexe tripartite MexAB-OprM tout-en-un (méthode 1)</u> .....	101
E) <u>Assemblage du complexe tripartite MexAB-OprM séquentiel (méthode 2)</u> .....	103
<b><u>Chapitre 3 :</u></b>	
<b><u>Reconstitution des protéines membranaires MexB et OprM dans un nanodisque minimal dépourvu de lipides exogènes</u></b> .....	<b>108</b>
<b><u>Chapitre 4 :</u></b>	
<b><u>Paramètres influant l'assemblage tripartite</u></b> .....	<b>142</b>
A) <u>Paramètres thermodynamiques et leur influence sur la formation du complexe MexAB-TolC</u> .....	142
B) <u>Influence des lipides sur l'assemblage tripartite et mise au point de techniques d'analyse quantitative de la formation du complexe tripartite</u> .....	147

B.1 Effets de l'utilisation de lipides endogènes.....	148
B.2 Stabilisation des protéines membranaires par Amphipols et formation du complexe tripartite.....	150
B.3 Mise au point de techniques d'analyse quantitative de la formation du complexe tripartite.....	156
<b><u>Chapitre 5 :</u></b>	
<b><u>Détermination de la structure du complexe MexAB-OprM en nanodisques par cryo-ME.....</u></b>	<b>164</b>
<b><u>Chapitre 6 :</u></b>	
<b><u>Considérations Générales.....</u></b>	<b>176</b>
A) Énergétique de l'interconversion entre un modèle court et un modèle long.....	176
B) Possibilité d'une interconversion sans variations d'épaisseur du périplasma.....	179
C) Stœchiométrie de l'assemblage : implications.....	183
<b><u>Discussion et conclusion.....</u></b>	<b>188</b>
A) Organisation structurale du complexe tripartite et mode d'assemblage.....	188
B) Stabilisation des protéines membranaires.....	193
<b><u>Matériel et Méthodes.....</u></b>	<b>196</b>
A) Production et purification des protéines MexA, MexB et OprM.....	196
B) Préparation des lipides.....	196
C) Production et purification des MSP1D1 et MSPE3D1.....	196
D) Préparation de nanodisques et nanodisques minimaux.....	197
E) Préparation de MexB, MexA et OprM reconstitués en Amphipols.....	197
F) Assemblage et purification des complexes tripartites.....	198
G) Gels dénaturants SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	198
H) Thermophorèse des mélanges MexAB-OprM.....	198
I) Microscopie Électronique à transmission en coloration négative.....	199
J) Cryo Microscopie Électronique à Transmission et analyse d'images.....	199
<b><u>Bibliographie.....</u></b>	<b>202</b>
<b><u>Annexe 1 : Chapitre publié dans Membrane Protein Structure and Function Characterization, Methods and Protocols (2017). 212</u></b>	

## Index personnalisé

Figure 1 : L'utilisation d'antibiotiques nouveaux conduit rapidement à l'apparition de souches résistantes.....	29
Figure 2 : Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmes entre 2004 et 2014 en France.....	30
Figure 3 : Schéma des enveloppes des bactéries gram-négatif (a) et gram-positif (b).....	32
Figure 4 : Mécanismes moléculaires de résistances aux antibiotiques chez les bactéries gram-négatif.....	34
Figure 5 : Principales familles de transporteurs réalisant l'efflux d'antibiotiques.....	36
Figure 6 : Structure cristallographique du transporteur RND AcrB à 3,5 Å de résolution.....	38
Figure 7 : Structure asymétrique du transporteur AcrB.....	41
Figure 8 : Interaction de petits peptides transmembranaires avec AcrB.....	43
Figure 9 : Structure cristallographique de TolC à 2,1 Å.....	45
Figure 10 : Structure cristallographique de MexA.....	47
Figure 11 : Voies d'accès des substrats au transporteur RND.....	51
Figure 12 : Différentes configurations du trimère AcrB au cours du cycle d'efflux.....	55
Figure 13 : AcrB présente une affinité pour un large spectre de molécules.....	56
Figure 14 : Modèle structural (court) du complexe AcrAB-TolC.....	59
Figure 15 : Comparaison des structures de PAP impliquées dans différents assemblages tripartites.....	60
Figure 16 : Comparaison des interfaces de AcrB concernées par la liaison de AcrA et des DARPin.....	63
Figure 17 : Les PAP forment des hexamères impliquant une stœchiométrie du complexe 3:6:3.....	67
Figure 18 : Modèles structuraux (long) des complexes tripartites MexAB-OprM et AcrABZ-TolC.....	69
Figure 19 : Le désassemblage du complexe tripartite requiert un apport d'énergie.....	71
Figure 20 : Le paramètre de forme CPP détermine l'auto-association des lipides et détergents en des phases aux structures différentes.....	73
Figure 21 : Solubilisation des protéines membranaires par un détergent.....	74
Figure 22 : Structure de quelques détergents courants.....	76
Figure 23 : La reconstitution d'une protéine membranaire peut se faire par plusieurs techniques.....	78
Figure 24 : Mesure de l'activité d'une protéine membranaire reconstituée en liposome.....	79
Figure 25 : Modèle de bactériorhodopsine insérée dans un nanodisque.....	81
Figure 26 : Stabilisation d'une protéine membranaire par la Saposine A.....	82
.....	84
Figure 27 : Formule chimique de deux Amphipols.....	84
Figure 28 : La facilité d'échange des Amphipols en font un outil versatile.....	85
Figure 29 : Solubilisation de lipides par SMA.....	87
Figure 30 : Résultats de purification des MSPs.....	92
Figure 31 : Propriétés structurales des MSP.....	93
Figure 32 : Schéma du processus de reconstitution de OprM en nanodisque.....	94
Figure 33 : Détermination du ratio protéine:MSP:lipides.....	95
Figure 34 : Reconstitution en nanodisque de la protéine OprM.....	96
Figure 35 : Reconstitution en nanodisque de la protéine MexB.....	98
Figure 36 : Différentes espèces sont produites pendant le processus de co-reconstitution de MexAB-ND.....	100
Figure 37 : Représentation schématique du mode d'assemblage tripartite tout-en-un.....	101

Figure 38 : Structure du complexe tripartite MexAB-OprM.....	102
Figure 39 : Représentation schématique du mode d'assemblage tripartite séquentiel.....	104
Figure 40 : Purification des complexes tripartites obtenus selon la méthode séquentielle.....	105
Tableau 1 : Criblage des conditions de production des complexes tripartites MexAB-OprM. .....	144
Figure 41 : Un excès de MexA favorise la formation de complexes par enrichissement d'une population soluble et active de la protéine. ....	146
Figure 42 : Les lipides endogènes d'E.coli entraînent la formation d'assemblages classiques. .....	149
Figure 43 : Schéma général de reconstitution en Amphipol. ....	150
Figure 44 : Reconstitution des protéines OprM et MexB en Amphipols.....	151
Figure 45 : OprM-APOL permet la formation d'un complexe tripartite. ....	153
Figure 46 : Reconstitution de MexA en Amphipol. ....	155
Figure 47 : Purification sur billes streptavidine de complexes MexAB-OprMBAPOL.....	157
Figure 48 : Principe de la thermophorèse ..... .....	159
Figure 49 : Mesure d'un mélange MexA, MexB-ND et OprM-NDAlexa647 par thermophorèse.....	161
Figure 50 : Observation des pompes à efflux MexAB-OprM par cryo-ME.....	165
Figure 51 : Carte de densité de la pompe à efflux MexAB-OprM.....	166
Figure 52 : Modèle atomique de l'Assemblage 1 de la pompe MexAB-OprM.....	167
Figure 53 : Contacts MexA-OprM au sein du complexe tripartite. ....	168
Figure 54 : Alignement des MexA-Intra et MexA-inter montre des différences entre la position des domaines Membrane Proximal et tonneau $\beta$ .....	169
Figure 55 : Contacts entre MexA-inter et MexB.....	170
Figure 56 : Contacts entre MexA-intra et MexB.....	171
Figure 57 : MexB adopte une conformation trimérique asymétrique au sein du complexe tripartite.....	172
Figure 58 : Comparaison des modèles long et court du complexe tripartite.....	177
Figure 59 : Schéma présentant l'effet de l'interaction MexAB sur MexA..... F.....	180
Figure 60 : MexA présente des segments de séquence caractéristiques de protéines non structurées. ....	181
Figure 61 : MexA présente des domaines structuraux désordonnés. ....	182
Figure 62 : Structure de la pompe MacAB-TolC.....	192

## Avant-propos

Le projet de ma thèse de doctorat visait à mieux comprendre les mécanismes moléculaires des complexes d'efflux de médicaments impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Le laboratoire avait récemment mis au point une méthode de reconstitution *in vitro* des complexes membranaires tripartites à partir de protéines d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* appartenant aux systèmes d'efflux RND responsables de l'exportation des drogues hors de la bactérie. L'originalité de la reconstitution du complexe repose sur l'utilisation de nanodisques lipidiques capables de stabiliser les trois protéines membranaires entre deux nanodisques. Le défi suivant consistait à mieux comprendre le processus d'assemblage, de décrire les paramètres essentiels le gouvernant et aussi d'en obtenir la structure par cryo-microscopie électronique, en travaillant sur ce point avec Marie Glavier également étudiante en thèse.

En effet bien que cette première étude montrait un assemblage tripartite spontanée des trois protéines MexA, MexB et OprM de *Pseudomonas aeruginosa*, il était tout aussi important de mettre en évidence les étapes clés et/ou les facteurs responsables de l'assemblage dans l'objectif d'en améliorer le rendement de formation. Plus fondamentalement, la compréhension moléculaire de la mise en place de l'assemblage tripartite pourrait ouvrir la voie vers le développement rationnel d'inhibiteurs spécifiques de la formation du complexe.

Les développements récents des méthodes de stabilisation des protéines membranaires m'ont permis d'étudier certains de ces paramètres. La cryo-microscopie électronique à transmission sur particules uniques était bien adaptée à la détermination de la structure 3D de MexAB-OprM à une résolution quasi atomique. Avant d'envisager ces expériences il fallait assurer la

stabilité du complexe tripartite à une concentration élevée. J'ai donc revisité le protocole du complexe de formation tripartite pour la préparation d'un échantillon susceptible d'être soumis à une analyse cryo-EM.

Le chapitre 1 couvre l'état actuel des connaissances sur les systèmes d'efflux RND, notamment les systèmes homologues MexA-MexB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* et AcrA-AcrB-TolC d'*Escherichia coli*.

Dans le chapitre 2, je présente l'utilisation de nanodisques pour la stabilisation des composants du système tripartite MexA-MexB-OprM et la réalisation de l'assemblage tripartite par deux méthodes.

Dans le chapitre 3, une méthode originale de stabilisation des protéines membranaires est présentée et résumée. Celle-ci fait l'objet d'un article accepté pour publication avec modifications mineures : "Minimal Nanodisc without exogenous lipids for stabilizing membrane proteins in detergent-free buffer".

Le chapitre 4 traite de l'étude des paramètres gouvernant l'assemblage du système tripartite MexA-MexB-OprM et sa quantification en solution par des approches de biochimie et de microscopie électronique.

Le chapitre 5 présente la structure 3D du système tripartite MexA-MexB-OprM déterminée par CryoEM à une résolution quasi atomique. Enfin, dans le chapitre 6, j'examine quelques considérations énergétiques afin de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage du complexe tripartite. Ce chapitre sera suivi d'une discussion générale et de mise en perspective des résultats.







# **Chapitre I :**

## **Résistance aux antibiotiques :**

### **un problème croissant de santé publique.**

Charles Darwin publiait en 1859, dans son livre *L'origine des espèces*, une première ébauche de la théorie de l'évolution. Elle deviendrait bientôt le fondement de ce nouveau domaine de la science qui adviendrait formellement une centaine d'années plus tard, la biologie. Il décrivit comment des variations aléatoires affectant des organismes individuels modifiaient leurs perspectives de reproduction et de survie, de sorte que les attributs des variants les plus performants sont transmis à la génération suivante tandis que les autres finissent par disparaître de la population. Les itérations successives du processus de modification des individus ensuite soumis au crible de la sélection naturelle engendra la diversification et la spécialisation du vivant au cours du temps long qui fut celui du développement de la vie depuis son apparition sur Terre, estimée à 4 Ga (Betts, 2018). Le principe de lutte de l'organisme pour sa propre survie apparut dès lors essentiel à la compréhension de l'organisation du vivant ainsi que de ses transformations. Dans ce contexte, les représentants modernes du domaine des eubactéries, plus communément nommées bactéries, sont le fruit d'un effort évolutif continu de plus de 3,4 milliards d'années au cours desquelles il aura été nécessaire pour chacune des espèces qui le composent de mettre en place des mécanismes efficaces pour conquérir et défendre les niches écologiques qu'elles se sont finalement appropriés. A cette fin, une méthode simple et efficace consiste à synthétiser des composés cytotoxiques, des antibiotiques, qui au-delà d'une certaine concentration intracellulaire entraînent la mort des cellules d'une espèce compétitrice et garantissent la

survie de celle qui sécrète ces substances dans le milieu. Naturellement, ce mode de lutte pour la survie a entraîné l'apparition d'une pression de sélection vigoureuse en faveur des organismes qui seraient en mesure d'échapper aux effets néfastes de ces composés cytotoxiques. Ce que nous qualifions donc de résistance aux antibiotiques est un aboutissement nécessaire et inévitable de la théorie de l'évolution, dans la mesure où peuvent émerger des artifices de défense efficaces, sans grande difficulté.

Ce fut Alexander Fleming, en 1929, qui découvrit le premier un antibiotique d'origine fongique, la pénicilline. Cette molécule avait la capacité d'inhiber la croissance d'une culture de *staphylococci* sur boîte de pétri et les premiers tests cliniques sur l'Homme démontrèrent la grande efficacité de ce composé pour traiter les infections bactériennes (Lobanovska 2017). Cependant, il ne fallut pas longtemps pour qu'apparaissent les premiers signes de résistance à cette nouvelle molécule, déjà largement utilisée. Dès 1942, quatre souches différentes de *S. aureus* isolés chez des patients hospitalisés révélèrent un mécanisme de contournement de l'action de la pénicilline (Rammelkamp, 1942), et vingt années plus tard, 80% des souches *S. aureus* responsables d'infections étaient insensibles à ce premier antibiotique (Lowy 2003). Rien de surprenant ni d'inattendu ici. Alexander Fleming, à l'occasion de la réception du prix Nobel de Physiologie et de Médecine qui lui fut accordé en 1945, avait lancé un avertissement à la société tout entière au sujet du risque d'un recours inconsidéré aux antibiotiques. Lamentant l'automédication d'un patient ignorant qui ne s'infligerait pas une dose suffisante de pénicilline pour neutraliser totalement la population infectieuse de bactéries qui l'accablent, mais au contraire, favoriserait l'émergence d'une souche résistante, A. Fleming prévenait ; si le négligent contamine un proche et que ce dernier contracte une infection plus sérieuse, par exemple une pneumonie, mais que les bactéries responsables sont désormais indifférentes au traitement antibiotique, entraînant la mort du malheureux, c'est bien la responsabilité du

patient indigent qui serait en cause. Et A. Fleming d'expliciter la morale suivante : « si vous utiliser de la pénicilline, consommez la dose adéquate ». L'avertissement est devenu prédiction et après plusieurs décennies de mauvaises pratiques de prescription (Ventola 2015) le monde doit faire face à une véritable crise sanitaire.

L'insouciance qui a pu habiter un temps l'esprit des professionnels de santé est désormais disparue. Succédant à l'âge d'or de la découverte de nouveaux antibiotiques (Dantas 2014), qui s'étend jusqu'au milieu des années soixante et qui a vu la commercialisation de composés divers tels que la streptomycine, la tétracycline et les céphalosporines, un âge d'inertie des recherches fructueuses à la poursuite de nouvelles molécules antibiotiques laisse présager un avenir sombre où l'arsenal disponible pour combattre les infections bactériennes résistantes se trouverait en délicatesse. En effet, s'il y avait des dizaines d'antibiotiques innovants mis sur le marché dans les années 90, la décennie passée n'a vu l'apparition que d'une seule molécule nouvelle (Hede 2014 et figure 1). Plus inquiétant encore, le rythme de développement des résistances s'est accru à mesure qu'a décliné notre capacité à produire de nouveaux médicaments et l'utilisation d'antibiotiques, tels que les carbapénèmes, normalement réservés aux cas de force majeure et aux infections nosocomiales présentant des facteurs de résistance voire de multi-résistance, est de plus en plus courant même pour des pathologies « bénignes » et l'on peut déjà observer l'apparition de souches résistantes.

En France, le rapport du groupe de travail pour la préservation des antibiotiques (2014), a estimé que chaque année plus de 150 000 patients sont infectés par une bactérie pluri-résistante entraînant la mort pour 12 500 d'entre eux, une tendance en augmentation (figure 2). A l'échelle mondiale, plus de 10 millions de personnes pourraient succomber sous le coup d'infection par des bactéries résistantes à l'horizon 2050.

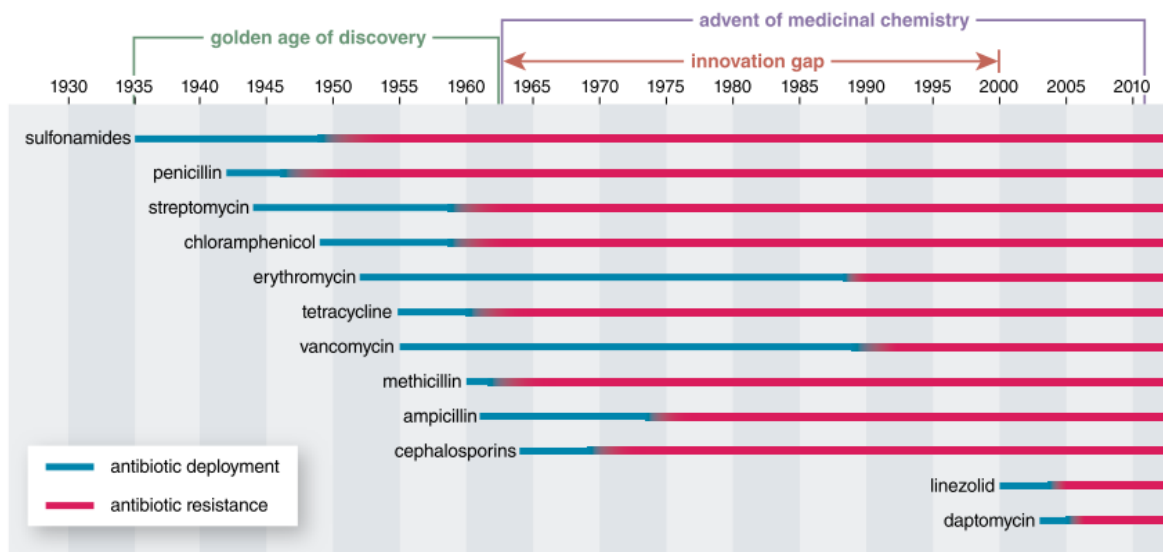


Figure 1 : L'utilisation d'antibiotiques nouveaux conduit rapidement à l'apparition de souches résistantes. Après les années 70 le développement de nouvelles molécules est devenu particulièrement difficile (Dantas 2014).

Bien qu'il soit permis d'espérer que les efforts de recherche motivés par la gravité de la situation actuelle et à venir viennent étendre de nouvelles molécules l'arsenal déjà existant, un glissement s'opère progressivement vers des thérapies alternatives. Au-delà des réflexions sur la posologie des antibiotiques la mieux à même d'éviter l'apparition de résistances, certains chercheurs essaient désormais de manipuler les pressions de sélection qui s'imposent aux bactéries lors d'un traitement antibiotique en alternant par exemple la nature chimique de ces derniers de sorte que, ayant des modes d'action différents, la population bactérienne ne puisse pas développer de résistance.

Enfin, un regain d'intérêt anime les recherches concernant les prédateurs naturels des bactéries, que l'on appelle bactériophages. Ces virus aux structures remarquables sont pour certains capables d'infecter les bactéries devenues résistantes à de nombreux antibiotiques, et

se multipliant en leur sein, entraînent leur mort. Les bactériophages présentent en plus un avantage non négligeable, celui de la spécificité. Ils ne s'attaquent qu'à une souche donnée de bactéries et n'affectent pas les autres qui sont libres de continuer leur vie paisible. Des essais cliniques sont en cours, notamment en Europe et en France par le biais de l'initiative phagoburn (<http://www.phagoburn.eu/>).

Une dernière stratégie impliquant les phages consiste à modifier leur génome pour y incorporer un système CRISPR-Cas9 capable d'exciser les séquences codant pour des facteurs de résistance chez les bactéries.

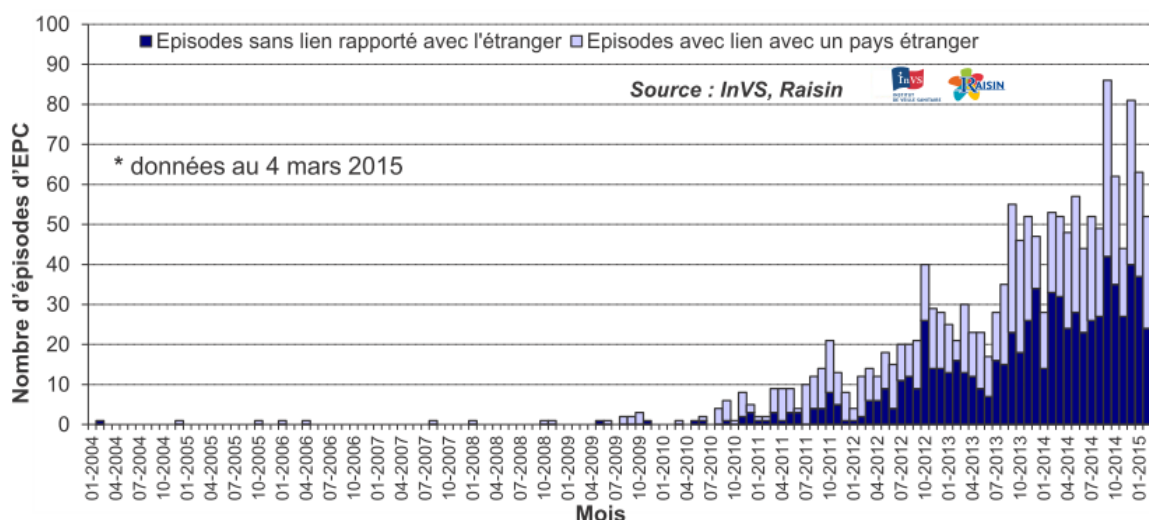


Figure 2 : Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases entre 2004 et 2014 en France.

## A) Mécanismes de résistance

Les micro-organismes ont plusieurs stratégies à leur disposition pour contrer les effets de molécules antibiotiques. Le premier de ceux-ci tient à la réduction de la diffusion des molécules vers leur compartiment cellulaire d'action. Intéressons-nous donc à l'enveloppe bactérienne.

Parmi les bactéries, il convient de distinguer deux grandes familles selon l'ultrastructure de la paroi des cellules considérées. Les noms d'usage employés pour identifier les groupes de cette classification font référence à un test colorimétrique développé par le microbiologiste Hans Christian Gram en 1884. Le colorant cristal violet, chargé positivement et diffusible au travers des membranes biologiques, interagit avec les molécules chargés négativement et notamment les peptidoglycanes puis forme un complexe sous action d'une solution d'iode. Une étape de décoloration à l'alcool permet de libérer les complexes chromogènes des bactéries dites gram-négatif qui adoptent une teinte rose après coloration au safranin. Les bactéries gram-positif retiennent les complexes d'iode et de cristal violet et apparaissent donc violettes. Ce test simple met en évidence une différence majeure entre ces deux types de bactéries. Les bactéries gram-négatif possèdent deux membranes lipidiques qui délimitent un espace périplasmique dans lequel se trouve un réseau de peptidoglycanes de quelques feuillettes d'épaisseur seulement n'excédant pas 3 nm tandis que les gram-positif arborent à la surface de leur membrane plasmique un échafaudage de peptidoglycanes complexe et dense, constitué de très nombreux feuillettes et pouvant atteindre une trentaine de nanomètres d'épaisseur (Beveridge 2000). Ces réseaux de peptidoglycanes recouvrent la circonférence des bactéries et ont un rôle structural en assurant la résistance mécanique de ces-dernières. Dans le cas des bactéries gram-négatif, l'enveloppe bactérienne sert aussi de palissade qui s'oppose à la diffusion passive des molécules vers le cytosol. Dans le reste de ce manuscrit, les mécanismes de résistance abordés le seront à travers le prisme des spécificités qui sont celles des bactéries



gram-négatif. Premièrement, car l'ensemble des stratégies mises en œuvre par les bactéries gram-positif le sont aussi chez les gram-négatif et que ces dernières, du fait de leur ultrastructure particulière (figure 3), en déploient d'autres, distinctes qu'il ne serait pas possible de décrire le choix eût-il été différent. Deuxièmement, le système d'étude qui fait l'objet de cette thèse provient d'une bactérie de ce type et enfin, les bactéries gram-négatif sont probablement aujourd'hui considérées comme les pathogènes les plus dangereux dans un contexte de résistance croissante aux antibiotiques.

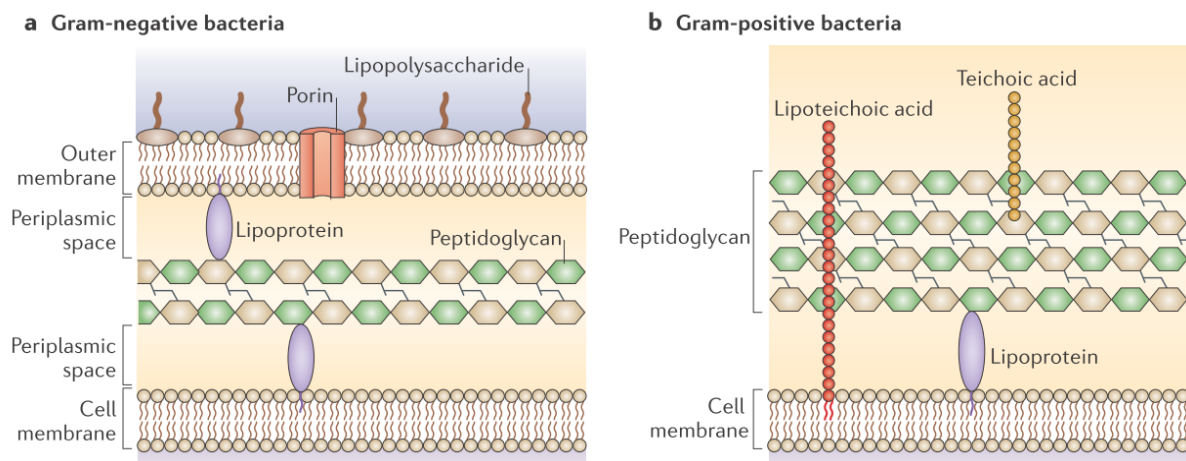


Figure 3 : Schéma des enveloppes des bactéries gram-négatif (a) et gram-positif (b). Les bactéries gram-négatif sont dotées d'une membrane externe qui délimite un espace périplasmique contenant quelques feuillet de peptidoglycanes. Cette membrane externe a une composition lipidique asymétrique exposant des lipides particuliers au milieu extérieur les LPS. Cette organisation constitue une barrière efficace contre la diffusion passive des antibiotiques. Les bactéries gram-positif sont plus simples, arborant un large réseau de peptidoglycanes lié à la membrane plasmique par des molécules d'acides lipoteichoïques (Brown 2015).

Les cibles des composés antibiotiques sont généralement situées dans le périplasme ou le cytosol de la bactérie, ce qui nécessite que ladite molécule traverse au moins une membrane lipidique, par diffusion au travers d'une porine. Cette protéine insérée dans la membrane externe y forme un pore non spécifique qui laisse passer les molécules de petite taille. La molécule antibiotique peut aussi traverser la membrane par équilibres successives entre le milieu aqueux extracellulaire et le milieu hydrophobe de la membrane externe, puis entre cette dernière et le périplasme aqueux, et une dernière fois au niveau de la membrane interne pour atteindre le cytoplasme. La composition lipidique particulière de la membrane externe des bactéries gram-négatif, affichant une charge négative nette importante, réduit *de facto* l'entrée de composés eux-mêmes chargés négativement. De plus l'encombrement de la membrane par des résidus de sucres qui composent les LPS s'oppose là encore à la diffusion massive de principes actifs vers le périplasme, en particulier par insertion dans le feuillet externe de la membrane (figure 4A).

Quand bien même la molécule d'antibiotique atteindrait son compartiment cellulaire d'intérêt, les bactéries ont encore la possibilité de sécréter des enzymes capables de métaboliser ces molécules pour les rendre inefficaces (figure 4C, D et F). Le phénomène de reconnaissance spécifique entre une molécule et sa cible impliquant deux partenaires, s'il n'est pas possible de dégrader l'antibiotique il est toujours possible de modifier son site de fixation à l'enzyme qu'il doit inhiber. Ainsi les bactéries ont développé des artifices de modification chimique de certaines enzymes clés (figure 4E). Elles peuvent aussi séquestrer les molécules d'antibiotiques pour éviter qu'elles n'atteignent leur cible comme c'est par exemple le rôle des pentapeptides (figure 4G).

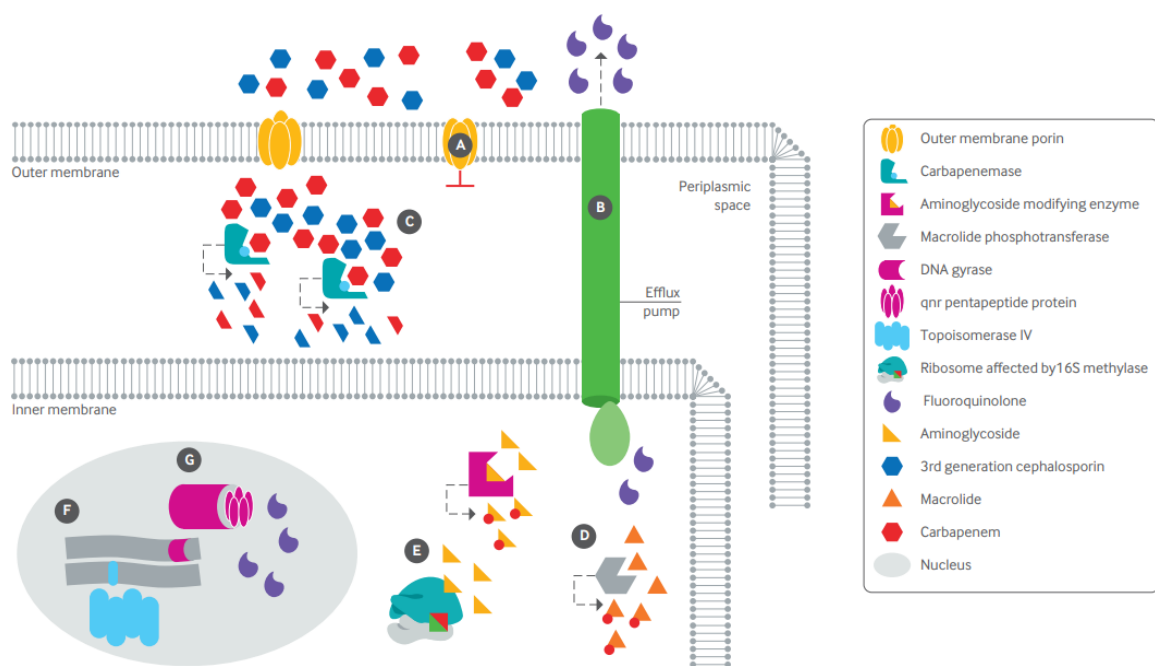


Figure 4 : Mécanismes moléculaires de résistances aux antibiotiques chez les bactéries gram-négatif. A) Réduction de l'influx d'antibiotiques par diminution de la perméabilité membranaire. B) Efflux actif des drogues depuis le cytosol ou le périplasma par l'expression de pompes à efflux tripartites. C) Dégradation enzymatique des antibiotiques. D) Modification de l'antibiotique. E) Modification de la cible par attachement de groupement méthyle sur l'enzyme concernée. F) Mutation dans les gènes de la gyrase et la topoisomerase IV rend les fluoroquinolones inefficaces. G) Les pentapeptides Qnr piègent les fluoroquinolones et évitent leur interaction avec l'ADN (Iredell 2016).

Enfin, un mécanisme de résistance ubiquitaire, présent aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, consiste à exporter les molécules cytotoxiques hors de la cellule au moyen de transporteurs membranaires, qui dans le cas des bactéries gram-négatif peuvent prendre l'apparence de véritables pompes à efflux (figure 4B). Il existe six superfamilles de transporteurs membranaires qui se distinguent par leur spécificité de substrat, leur homologie de séquence, leur fonction de transport et la source d'énergie mise en jeu pour leur

fonctionnement (figure 5) ; ATP-Binding Cassette (ABC), Major Facilitator Superfamily (MFS), Small Multidrug Resistance (SMR), Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE), Resistance-Nodulation-cell Division (RND) et Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) encore mal connue (Delmar 2014, Hassan 2015). A l'exception de la famille ABC qui utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP, l'ensemble des autres familles sont des transporteurs secondaires qui recourent à l'énergie d'un gradient de protons ou parfois de sodium pour réaliser l'efflux de leur substrat. La famille RND se compose d'antiports généralement trimériques capables d'exporter un grand nombre de substrats différents et qui chez les bactéries gram-négatif adoptent une architecture tripartite formant un canal à travers l'enveloppe bactérienne, nous y reviendront. Les systèmes modèles pour ces édifices tripartites sont AcrAB-TolC chez *E. coli* et MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*, qui sont exprimées de manière constitutive et dont la sur-expression chez des mutants conduit au développement de résistances (Piddock 2006), mais il en existe bien d'autres dont l'expression est régulée par la présence de leur substrat dans le milieu.

Les pompes de la famille RND sont associées à des phénomènes cliniques de résistance aux antibiotiques et de pathogénicité et font l'objet de recherches plus approfondies tant l'intérêt thérapeutique est grand. Par exemple, une étude sur la souche *Escherichia coli* issue de cas cliniques au Japon a permis de révéler une forte corrélation entre la résistance des souches à la fluoroquinolone et la sur-expression de la pompe AcrAB-TolC (Yasufuku, 2011). Dans un hôpital français il a été mis en évidence que la sur-expression des pompes MexAB-OprM était responsable du phénotype de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* (Llanes, 2004).

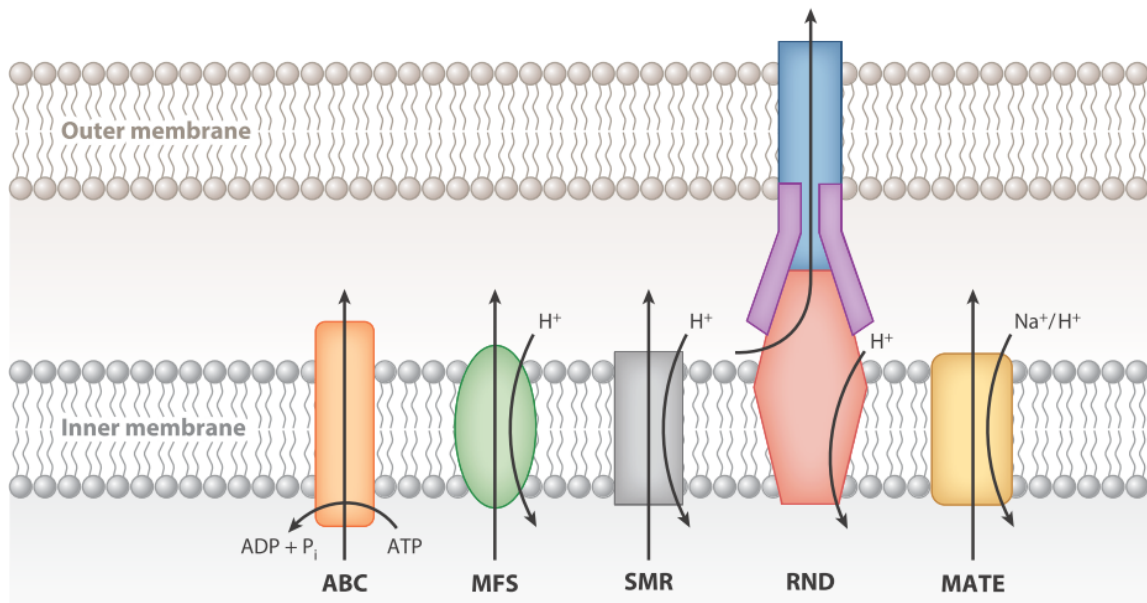


Figure 5 : Principales familles de transporteurs réalisant l'efflux d'antibiotiques. Les transporteurs des familles ABC, qui exploitent l'énergie d'hydrolyse d'ATP, et des familles MFS, SMR, RND ou MATE qui utilisent l'énergie d'un gradient de protons ou de sodium, catalysent l'efflux de drogues depuis le cytosol vers le périplasma. Chez les bactéries gram-négatif, les transporteurs de la famille RND forment des assemblages tripartites qui traversent l'enveloppe bactérienne et réalisent l'efflux de drogues depuis le périplasma vers le milieu extracellulaire. De tels assemblages sont aussi possibles pour certains transporteurs des familles ABC et MFS (Delmar 2014).

## B) Pompes à efflux tripartites AcrAB-TolC et MexAB-OprM

Dans ces complexes composés de trois protéines membranaires différentes dont chacune est essentielle pour le développement d'un phénotype résistant (Blair 2009), le transporteur RND se trouve inséré dans la membrane interne et catalyse l'efflux de drogues vers un canal inséré dans la membrane externe et qualifié de facteur de membrane externe (OMF, Outer Membrane Factor), le tout est maintenu en place par l'intermédiaire de protéines périplasmiques adaptateur (PAP, Periplasmic Adaptor Protein) ou anciennement, protéines de fusion membranaire (MFP, Membrane Fusion Protein). Les structures cristallographiques de

chacun des partenaires sont connues et malgré les différences de séquence d'acides aminés qui sont parfois importantes, l'organisation structurale des homologues est identique.

## B.1 Structures des transporteurs RND AcrB et MexB

La structure de la protéine AcrB de *E. coli*, possédant 1 049 acides aminés, a été résolue à 3,5 Å et se révèle être un trimère composé d'une région périplasmique de 70 Å de long et d'un diamètre de 100 Å se décomposant en deux domaines, le premier dit d'ancrage à l'OMF de 30 Å de long et le second, dit de transfert, qui regroupe l'essentiel des structures responsables de la reconnaissance, de la liaison et du transport des substrats, qui s'étend dans le périplasme sur 40 Å (figure 6). Enfin la région transmembranaire insérée dans la membrane interne des bactéries, mesure 50 Å de long et possède un diamètre de 80 Å (Murakami et al., 2002).

Ce domaine transmembranaire est constitué d'un total de 36 hélices  $\alpha$ , soit 12 par monomère, et présente une pseudo-symétrie d'ordre 2 dont l'axe est normal au plan de la membrane, séparant en deux chaque monomère à la jonction entre les hélices TM6 et TM7, matérialisée par la présence d'une hélice horizontale courte, nommée I alpha, accolée à la face interne de la membrane. De plus, une zone d'interaction entre protomères adjacents pour la stabilisation du trimère existe au niveau des hélices TM8 et TM1. Enfin, le domaine transmembranaire contient trois acides aminés chargés essentiels à sa fonction, Asp 407, Asp 480 et Lys 940 situés pour les deux premiers au milieu de TM4 et au milieu de TM10 pour le dernier et qui sont impliqués dans la translocation des protons par formation d'un réseau de liaisons hydrogènes. Il est intéressant de noter que ces deux hélices se font face dans chacun des monomères au sein desquels elles occupent une position centrale.

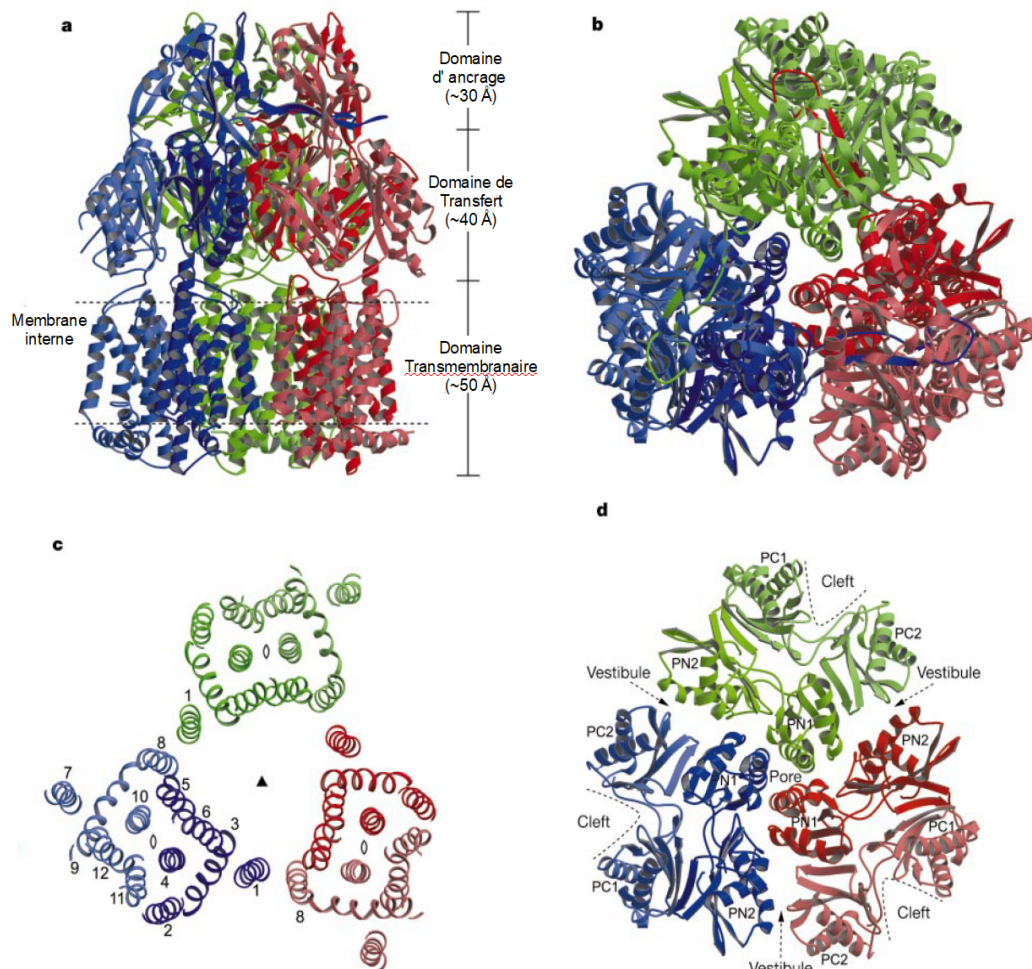


Figure 6 : Structure cristallographique du transporteur RND AcrB à 3,5 Å de résolution. a) Vue de côté présentant les trois principaux domaines, le domaine transmembranaire inséré dans la membrane interne, les domaines périplasmiques de transfert, responsable de la captation et de l'acheminement du substrat, et d'ancrage à l'OMF, qui interagit avec les partenaires protéiques du transporteur. b) La Vue de dessus révèle l'organisation trimérique du transporteur et l'importance de la boucle DN enchâssée dans le protomère adjacent. c) Coupe transversale à la moitié du domaine transmembranaire qui figure la répartition des hélices ainsi que les axes de symétrie trois (triangle) et de pseudo ordre deux (ellipse). d) Coupe transversale du domaine de transfert où apparaissent les sous-domaines PC2/PN1 et PC1/PN2, les vestibules et la poche proximale (cleft) par lesquels les substrats entrent dans le transporteur. Chaque protomère a une couleur différente, un dégradé foncé à clair indique la progression du N-terminal vers le C-terminal. Adapté de Murakami 2002, code PDB : 1IWG.

Le domaine de transfert est quant-à-lui composé de 4 sous domaines : un segment peptidique périplasmique constitué des sous-domaines PN1 et PN2 qui sont encadrés par les hélices TM1 et TM2, et selon une organisation similaire du fait de la pseudo-symétrie, les sous-domaines PC1 et PC2 encadrés par les hélices TM7 et TM8. Pour chacun de ces sous-domaines, il existe un motif caractéristique et répété deux fois qui consiste en deux brins  $\beta$  qui flanquent une hélice  $\alpha$ , le tout orienté de telle manière à ce que les feuillets  $\beta$  soient tournés vers l'intérieur de la protéine. Le sous-domaine PN1 abrite une hélice particulièrement importante, nommée  $N\alpha_2$ , responsable de l'obstruction et de la libération du pore autorisant l'efflux des substrats. On observe, de plus, la présence d'un vestibule entre les sous-domaines PC1 et PC2 de protomères adjacents qui délimitent l'entrée d'un chemin d'accès pour les substrats provenant du périplasma ou du feuillet externe de la membrane interne, vers une cavité centrale juste en dessous du pore. Cette cavité est aussi située entre les sous-domaines PC1 et PC2, d'un même protomère cette fois-ci, et mesure 40 Å de long, 15 Å de profondeur et 20 Å de large. Celle-ci se divise en deux parties, une poche à substrat proximale et une poche à substrat distale. Ces deux poches communiquent au moyen du basculement d'une boucle principalement constituée de glycines et de phénylalanines. Nommé G-loop, cette dernière organise le transfert vectoriel des substrats depuis la poche proximale vers la poche distale, localisée juste en-deçà du pore, au cœur du monomère du transporteur RND, entre les sous-domaines PN1 et PN2. Comme le vestibule, la cavité centrale est accessible depuis le périplasma.

Enfin, le domaine d'ancrage à l'OMF se décompose en deux sous-domaines, DC et DN, ce dernier comportant une structure tige-boucle de 35 Å enchâssée dans le protomère adjacent à proximité du sous-domaine DC, ce qui assure une forte cohésion du trimère. Cela est démontré par la perte de trimérisation qu'engendrent des mutations dans cette structure en



tige-boucle, notamment celles qui, à son extrémité, changent proline et arginine en glycine et alanine (Yu 2013). De plus, chacun de ces deux sous-domaines contiennent à leur extrémité une structure en boucle, particulièrement proéminente dans le cas de DN, dont il est supposé qu'elles interagissent avec les partenaires protéiques du transporteur lors de la formation du complexe tripartite.

En 2006, Murakami et al. mais aussi Seeger et al., ont proposé une nouvelle structure, à 2,8 Å et 3,0 Å respectivement, pour AcrB complexé à un substrat, cette dernière fait apparaître trois conformations différentes pour chacun des protomères suggérant trois étapes successives lors du cycle d'efflux : accès (A), fixation (T) et extrusion (E), (figure 7). Les principales différences d'une conformation à l'autre sont premièrement l'inclinaison de 15° de l'hélice N $\alpha$ 2 du conformère « extrusion » vers le protomère en conformation « fixation » ce qui ouvre le pore et libère le substrat vers l'OMF. Deuxièmement, le déplacement de l'hélice TM8 ferme l'accès des substrats à la poche proximale dans le conformère « extrusion » du fait du rapprochement des domaines PC2 et PC1. Enfin, une rotation de 45° de la Lys 940 de l'hélice TM10 vers la Thr 978 de l'hélice TM11 supprime le pont salin entre TM4 et TM10.

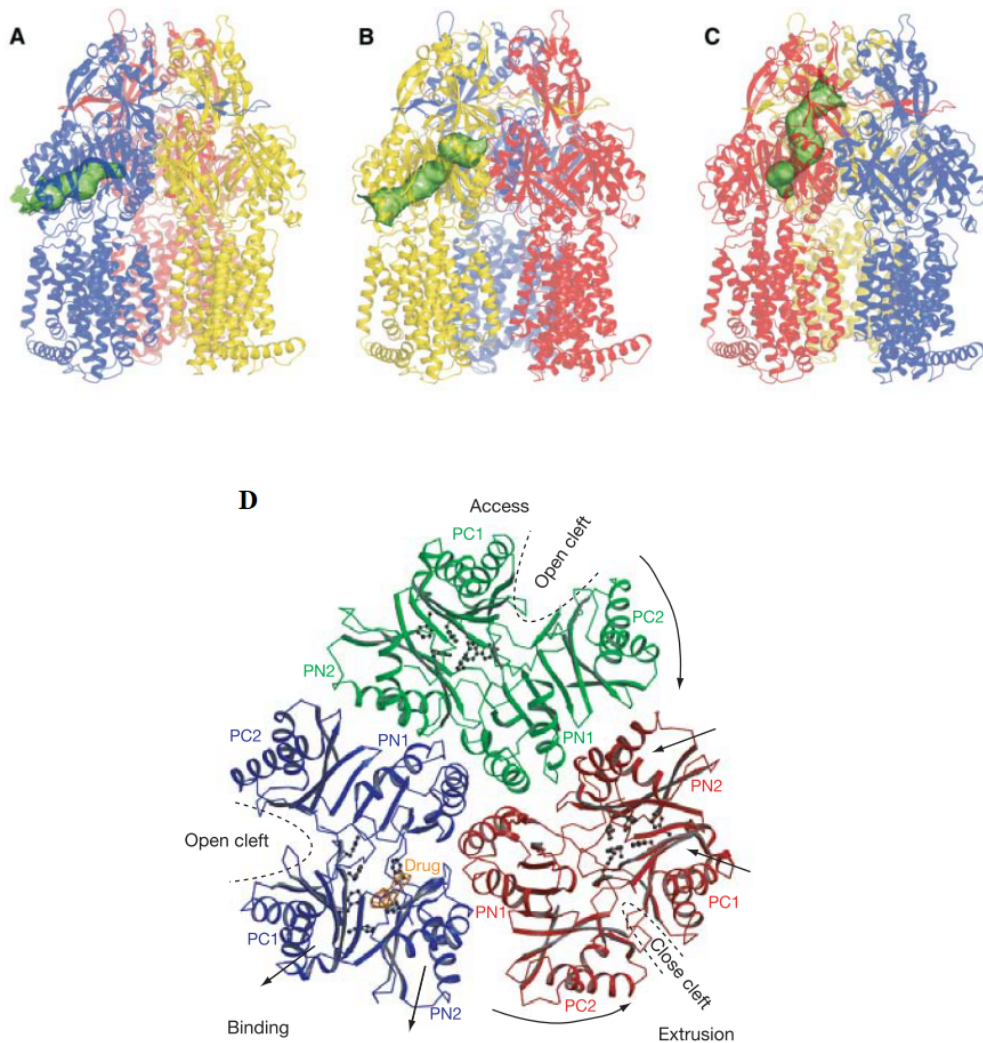


Figure 7 : Structure asymétrique du transporteur AcrB. Chaque protomère a une conformation différente représentative des trois étapes qui se succèdent au cours du cycle d'efflux. A-C) Le protomère en conformation Accès est représenté en bleu, Liaison en jaune et Extrusion en rouge. Le volume vert présente le chemin d'accès et de déplacement du substrat au sein du transporteur. A) En conformation Accès, l'interface PC1/PC2 est ouverte permettant l'entrée des substrats environ 1,5 Å au-dessus de la membrane. B) En conformation Liaison, le tunnel s'étend vers le domaine d'ancrage à l'OMF et travers les sous-domaines PN1/PN2. C) En conformation Extrusion, les sous-domaines PC1/PC2 se rapprochent fermant l'accès des substrats au transporteur tandis qu'une bascule du sous-domaine PN1 ouvre un chemin de sortie débouchant sur l'OMF lorsque le complexe est assemblé. D) Vue de dessus en coupe transversale présentant les mouvements des différents sous-domaines. Adapté de Murakami 2006 (2DHH) et Seeger 2006 (2GIF).

Il faut noter que AcrB a été copurifié avec des peptides membranaires, YajC et AcrZ, qui viennent se fixer dans son domaine transmembranaire au niveau des hélices TM9-12-11, site de liaison dont les acides aminés sont particulièrement conservés au cours de l'évolution (figure 8). La complexation avec ces peptides semble entraîner des modifications structurales dans les domaines périplasmiques du trimère de AcrB favorisant l'assemblage du complexe tripartite (Horsefield 2007) ou modifiant sa spécificité de substrat ; ainsi une souche  $\Delta$ YajC devient sensible aux  $\beta$ -lactames et une souche  $\Delta$ AcrZ augmente la sensibilité des bactéries testées à plus d'une vingtaine d'antibiotiques différents (Hobbs 2012). Aucun équivalent n'a été mis en évidence concernant MexB.

Enfin, AcrB pourrait être un récepteur d'une toxine protéique impliquée dans les phénomènes d'Inhibition Contact Dépendant (CDI) qui après translocation dans le périplasma de la bactérie par BamA, viendrait se fixer sur la partie périplasmique de AcrB (Aoki 2008).

Pour finir, une structure de MexB à 3,0 Å a été résolue par remplacement moléculaire de la carte de densité électronique à partir de la structure du cristal asymétrique de AcrB puisqu'il y a entre ces deux protéines 69,8% d'identité et 83,2% de similarité de séquence (Sennhauser et al., 2009). On retrouve donc la même organisation générale de la protéine qui ne sera pas davantage décrite ici.

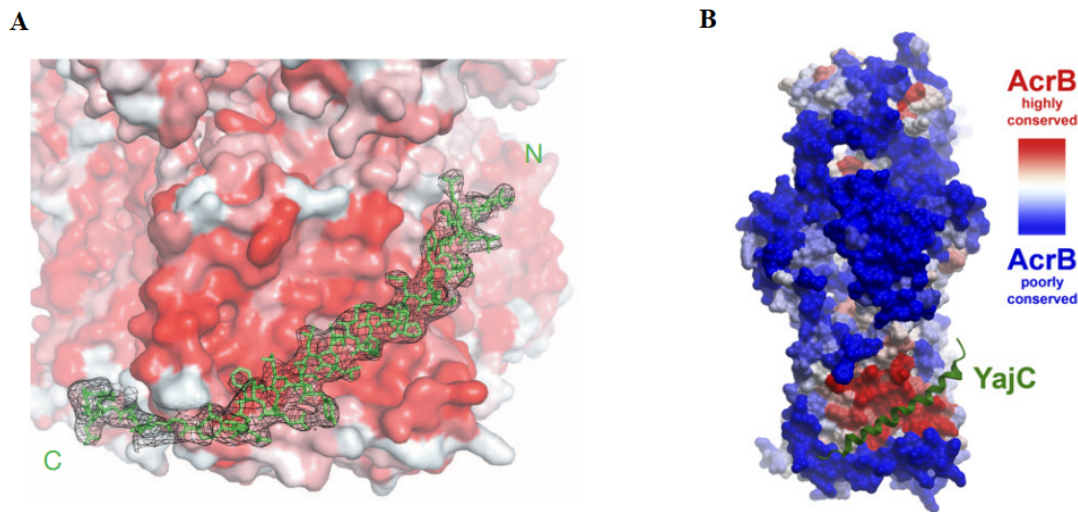


Figure 8 : Interaction de petits peptides transmembranaires avec AcrB. A) Structure cristallographique à 3,3 Å du complexe AcrB-AcrZ. Le peptide dont le N-terminal et C-terminal dépassent partiellement le périplasma et le cytosol respectivement est incliné de 45° par rapport au plan de la membrane et se fixe dans une dépression entre les hélices TM7 et TM11. B) Structure cristallographique du complexe AcrB-YajC à 3,5 Å. Le site ainsi que le mode de liaison sont similaires à ceux observés pour le complexe AcrB-AcrZ. Le dégradé de couleur du bleu vers le rouge indique les acides aminés les moins conservés vers plus conservés. La position de YajC sur AcrB a ceci de remarquable qu'elle se situe au niveau d'une séquence particulièrement conservée. Adapté de Du et al, 2014 (4CDI) et Horsefield 2007 (2RDD).

## B.2 Structure des protéines canal TolC et OprM

La protéine TolC d' *E. coli* est composée de 471 acides aminés et sa structure cristallographique a pu être déterminée pour les 428 premiers résidus avec une résolution de 2,1 Å (Koronakis et al., 2000). Une organisation trimérique d'une longueur de 140 Å est ainsi révélée, chaque protomère contribuant pour 4 brins  $\beta$  et 4 hélices  $\alpha$  à la structure d'ensemble. Cette dernière se décompose en trois domaines distincts, un domaine de feuillet  $\beta$  antiparallèles formant un tonneau de 40 Å enchâssé dans la membrane externe en conformation ouverte et donc accessible au solvant, un domaine périplasmique de 100 Å contenant 12 hélices  $\alpha$  arrangées en tonneau antiparallèle (2 longues, 4 courtes) formant un cylindre de diamètre interne de 35 Å offrant au solvant une cavité de 43 000 Å<sup>3</sup>, et un domaine mixte  $\alpha/\beta$  dit « équatorial » ceinturant le domaine  $\alpha$  à sa moitié environ par 3 hélices  $\alpha$  et 2 brins  $\beta$ . Ce domaine pourrait, par ailleurs, interagir avec le réseau de peptidoglycane. Il est possible de distinguer deux types de faisceaux d'hélices, un faisceau intérieur de superhélices antiparallèles composés des hélices H7 et H8 et un faisceau extérieur formé par la paire d'hélices H3 et H4. De plus, le pore, ouvert au niveau du tonneau  $\beta$ , est fermé par un anneau de résidus aspartate (Asp 374 et Asp 371) de diamètre 3,9 Å au niveau des hélices H8 de chacun des monomères (Andersen et al., 2002). Enfin les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  ont des torsions opposées, gauche et droite respectivement.

OprM, protéine de 468 acides aminés de *P. aeruginosa* ne possède que 21% d'identité de séquence avec son homologue TolC (Wong et al., 2001) mais la structure déterminée par cristallographie des rayons X à une résolution de 2,5 Å montre de nombreuses analogies structurales. Elle couvre 456 résidus soit 97,4 % de la protéine totale (Akama et al., 2004a). À l'instar de TolC, une organisation trimérique est retrouvée, chaque protomère apporte 4 brins  $\beta$  et 4 hélices  $\alpha$  au trimère. Ce dernier est composé d'un domaine organisé en tonneau  $\beta$  de 35 Å

et de diamètre de 6 à 8 Å inclus dans la membrane externe et dont les feuilletts ont une torsion droite, mais aussi d'un domaine d'hélices  $\alpha$  formant un tonneau de 100 Å et une cavité de 25 000 Å<sup>3</sup> fermée par le rapprochement des hélices du côté périplasmique et un triplet de leucine (Leu 412) provenant des hélices H8 de chaque monomère. Il existe un domaine équatorial moins imposant que celui de TolC, composé uniquement de 2 hélices. La présence d'une chaîne lipidique en N-terminal de la protéine, qui n'existe pas chez TolC, aide à l'ancrage membranaire probablement moins efficace si seulement médié par le tonneau  $\beta$  qui présente une fragilité structurale importante due aux 12 prolines et 33 glycines par monomère (Monlezun 2015). Les structures de la figure 9 présentent une protéine canal dans sa conformation de repos, en position fermée.

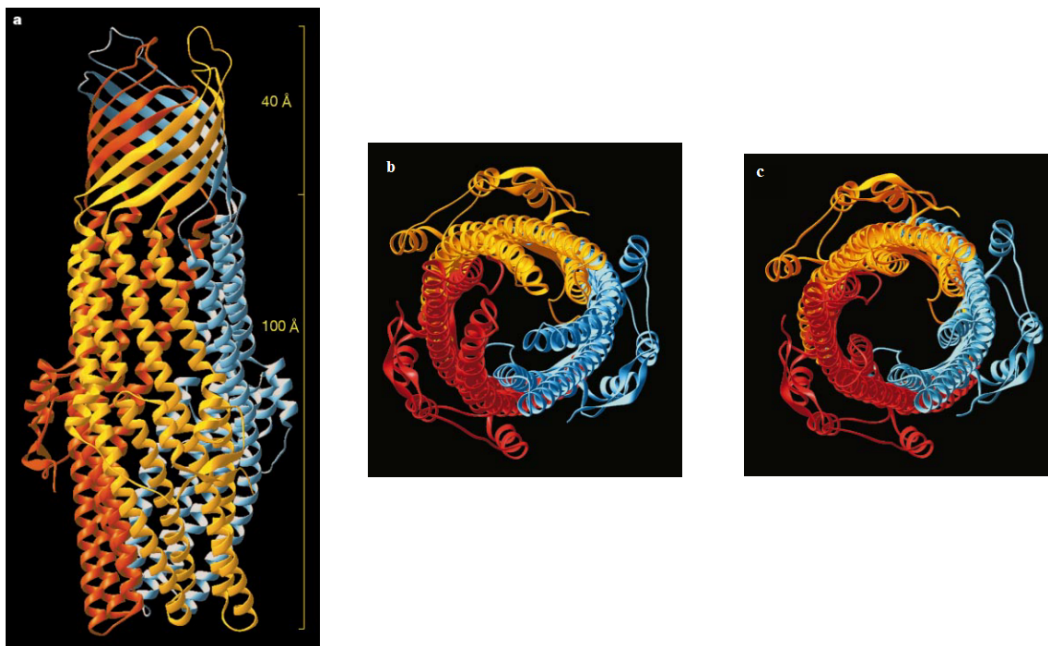


Figure 9 : Structure cristallographique de TolC à 2,1 Å. a) Vue de côté du trimère, chaque protomère a une couleur différente. La structure en tonneau, insérée dans la membrane externe, est constituée par 12 brins  $\beta$  à raison de 4 par protomère et forme un canal d'environ 4nm de diamètre. Un long faisceau d'hélices se prolonge dans le périplasma sur 10 nm pour former un canal qui accueille les substrats en provenance du transporteur. b) Vue de dessous, le canal est fermé du côté périplasmique par l'inclinaison des hélices H8 établissant des ponts salins par l'intermédiaire D374 et D371. c) Modèle du canal ouvert. Adapté de Koronakis 2000 (1EK9).

### B.3 Structures des protéines adaptateur périplasmique PAP, MexA et AcrA.

La structure de MexA, protéine de 360 acides aminés de *P. aeruginosa* dont le N-terminal permet l'ancrage à la membrane par une acylation post-traductionnelle, a été résolue à 2,4 Å pour les résidus 23 à 274 et révèle la présence de 3 domaines distincts (Akama 2004b, et figure 10). Un premier domaine qui forme une structure tige-boucle par l'association de deux hélices  $\alpha$  entre les résidus Ala 74 et Ala 102 et Lys 108 et Arg 133 respectivement. Un deuxième domaine,  $\beta$  et globulaire, adjacent au premier, est formé par 8 feuillets  $\beta$ , similaires en topologie au domaine lipoyl/biotinyl carrier. Enfin, le troisième domaine, globulaire et dénoté  $\alpha+\beta$  est composé de 7 brins  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . Cette protéine présente une grande flexibilité car ses différents domaines sont espacés de motifs structurellement peu contraints, il a donc fallu une nouvelle analyse des données cristallographiques pour identifier un quatrième domaine appelé Membrane Proximal (MP) (Symmons, 2009). Il présente une grande similarité de structures secondaires avec le domaine  $\beta$  et se compose des extrémités N et C-terminaux de la protéine arrangées en feuillets  $\beta$ .

La structure de AcrA, la protéine de 397 acides aminés de *E. coli*, a été obtenue à 2,7 Å pour les résidus 45-312, le reste de la séquence présentant trop de flexibilité comme mis en évidence par clivage protéolytique (Mikolosko 2006). AcrA possédant 62% d'identité et 73% de similarité de séquence avec MexA, les structures déterminées sont très proches et on y retrouve les mêmes domaines, à l'exception du domaine Membrane Proximal, néanmoins présent mais non résolu.

Par ailleurs, la suppression de la modification post traductionnelle de la PAP ne semble pas avoir d'effet délétère sur la fonction du complexe ni pour AcrA (Zgurskaya 1999) ni pour MexA (Yoneyama 2000). Il en va de même pour la présence d'un tag six histidines en C-

terminal, partie pourtant cruciale de la protéine.

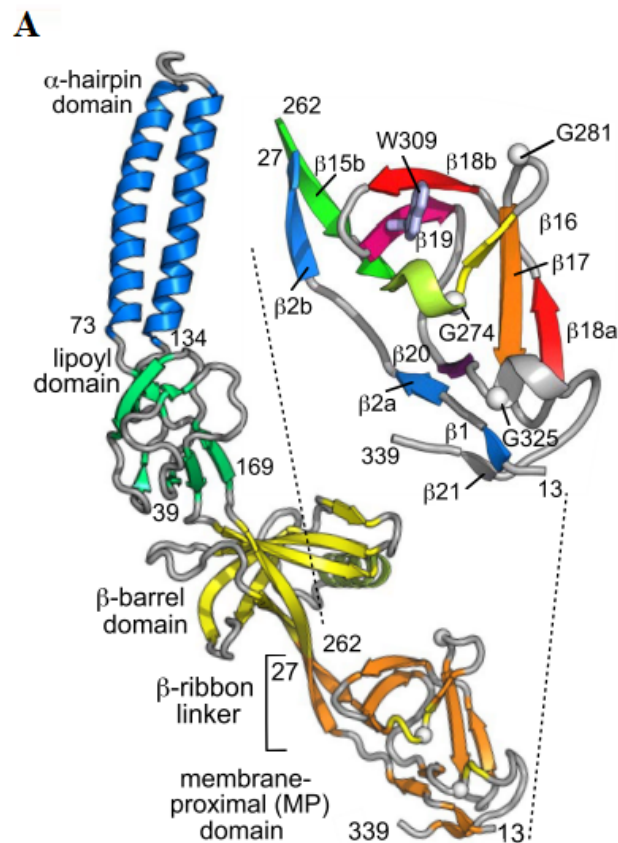


Figure 10 : Structure cristallographique de MexA. A) Structure à 2,4 Å de MexA telle que déterminée par Symmons 2009 (2V4D) après ré-affinement de la structure obtenue par Akama 2004b. La protéine est composée de deux moitiés, N-terminal et C-terminal, symétriques et de séquences similaires qui sont repliées l'une sur l'autre pour former quatre sous-domaines. Un domaine d'hélices en tige-boucle en interaction avec l'OMF ainsi que des sous-domaines lipoyl, tonneau  $\beta$  et Membrane Proximal qui sont principalement organisés en feuillets  $\beta$ . Le domaine Membrane Proximal est particulièrement flexible.

La grande flexibilité de ces protéines est démontrée par de nombreuses données expérimentales ; un fragment C-terminal de 90 acides aminés sensible à la digestion par la Thermolysine tandis que le fragment résistant aboutit à des dimères présentant quatre conformations différentes après diffractions aux rayons X; l'homologue MacA du système



tripartite ABC possède aussi 71 acides aminés peu structurés en C-terminal et une grande flexibilité des hélices par un mouvement de bascule autour du domaine lipoyl (Yum 2009); la mesure des dimensions de AcrA en solution par diverses méthodes permet de déduire les proportions d'un volume suivant 21 nm x 2,6 nm x 2,6 nm, la présence de magnésium contracte la structure aux dimensions suivantes 17x2,6x2,6nm (Zgurskaya 1999). Ces résultats sont corroborés par des modèles *in silico* (Vaccaro 2006, Wang 2012).

L'état oligomérique de la PAP est particulièrement difficile à élucider. Dans le cristal, cette dernière se présente sous forme d'un hexamère en contact via l'extrémité de ses hélices tige-boucles avec un heptamère, structure ouverte sur le côté dû à l'arrangement en spirale ascendante des MexA adjacents (Akama 2004b). Pourtant, AcrA purifié migre sur gel natif à un poids moléculaire apparent qui correspond à celui d'un trimère, comme MdtE, PAP d'un autre complexe tripartite RND de *E. coli* (Stenberg 2005). La réticulation chimique par l'agent DSP qui a un bras espaceur de 1,2 nm permet de copurifier des complexes AcrAB en l'absence de TolC sur lesquels se trouvent un dimère ou un trimère de AcrA. Aussi, dans une bactérie n'exprimant que AcrA, des pontages par l'agent DSG qui a un bras espaceur de 0,7 nm permettent de stabiliser des dimères et trimères de AcrA (Zgurskaya 2000). L'observation de trimères suggère une augmentation de l'état oligomérique par incrément d'un monomère de PAP. Les pH acides semblent déclencher l'oligomérisation de AcrA mais aussi celles des PAP homologues EmrA et MacA (Ip 2003, Tikhonova 2009). Ce résultat est partiellement confirmé par des chromatographies d'exclusion stérique qui montrent que AcrA non palmitoylé est un monomère, AcrA natif un dimère à pH 6 et un oligomère à pH 7,5 (Tikhonova 2011). Par ailleurs un mutant de AcrA, G363C, conduit à la formation d'un dimère en établissant un pont disulfure entre les extrémités C-terminales de deux monomères et retient une affinité pour son transporteur RND, or la délétion des résidus en C-terminal et N-

terminal de l'homologue MacA de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* diminue drastiquement sa capacité à former des hexamères (Yum 2009). De plus, MacA de *E. coli* est purifié sous forme de dimère comme AcrA. Une protéine chimérique de AcrA dimérique sans son ancre lipidique présente deux populations après purification, la première dimérique et la deuxième hexamérique (Xu 2011). Si l'état d'oligomérisation exact de la PAP reste en question, il semble désormais établi que les dimères de cette protéine sont capables de trimériser pour former un hexamère *in vitro* et *in vivo*. Cependant, l'implication des domaines N et C-terminaux ainsi que le rôle de l'acylation dans l'oligomérisation des PAP reste encore floue.

#### B.4 Mécanisme d'efflux des pompes RND et spécificité de substrat

Le transporteur de la famille RND est un antiporteur qui opère la translocation d'un proton du périplasme vers le cytosol. Les études structurales et physiologiques apportent des observations convaincantes que ce phénomène est couplé à l'export du substrat depuis le périplasme vers le milieu extérieur. En particulier, il a été observé que les concentrations en antibiotique pour lesquelles la croissance est inhibée de moitié (IC 50) sont plus grandes lorsque la pompe tripartite est en présence d'autres transporteurs de familles différentes (Tal et Schuldiner, 2009). Par exemple, les protéines MdfA, de la famille des MFS, et EmrE de la famille des SMR, catalysent le transport du cytosol vers le périplasme de différentes drogues. Les mutants dont les gènes codant pour ces deux protéines sont déléetées perdent presque complètement le phénotype de résistance, suggérant que l'antiporteur RND n'a accès qu'aux molécules présentes dans le périplasme. D'autres expériences, utilisant AcrB reconstitué en liposomes contenant des lipides fluorescents ont montré que ces derniers sont efficacement transportés par AcrB, probablement pris en charge depuis le feuillet externe de la membrane

interne (Zgurskaya, 1999). Une conclusion renforcée par une étude du chemin parcouru dans le transporteur, dont certains résidus clés avaient été mutés en cystéines, par son substrat couplé à un agent pontant fluorescent. Les acides aminés marqués se trouvaient alors essentiellement au niveau du vestibule (Husain 2011). Ces deux modes de captation de substrat par le transporteur sont en accord avec les structures cristallographiques qui font apparaître une entrée à proximité du feuillet externe de la membrane interne (vestibule) et une autre accessible depuis le périplasma et située 2 nm au-dessus de la membrane interne (cavité). Ceci a été confirmé par la détermination de structures cristallographiques de AcrB en présence de divers substrats tels que la rhodamine 6, le bromure d'éthidium ou la ciprofloxacine. Chacune de ces molécules a des sites de liaison au transporteur proche du vestibule mais aussi dans la poche proximale ou distale (Yu 2003). Par ailleurs, si ces deux poches à substrats communiquent par l'intermédiaire de la G-loop, de sorte que toutes les molécules extrudées se retrouvent *in fine* dans la poche distale, l'existence de deux sites de liaison en continuité l'un de l'autre permet une discrimination entre substrats de haut poids moléculaire (érythromycine, rifampicine) qui doivent impérativement se fixer en premier dans la poche proximale, et ceux de faible poids moléculaire (minocycline, doxorubicine) qui disposent d'un accès direct à la poche distale (Nakashima 2011). Ceci a pour conséquence supplémentaire d'autoriser la fixation simultanée de deux molécules sur un même monomère du transporteur et autorise un comportement coopératif de ce dernier vis-à-vis de certains substrats, suggéré précédemment par des mesures de cinétique d'efflux sur bactéries entières (Nagano 2009).

Récemment, une troisième voie d'accès dont l'existence théorique avait déjà été supposée sur la base de la structure du trimère d'AcrB, a été mise en évidence expérimentalement (Zwama 2018). Celle-ci est localisée au centre du trimère du transporteur RND, est accessible

par le vestibule mais aussi éventuellement par diffusion des molécules de substrats dans le feuillet interne de la membrane interne, donc par le côté cytosolique du transporteur, et semble être une voie préférentiellement utilisée par les molécules planes cationiques comme le bromure d'éthidium. Il est intéressant de noter que cette voie débouche, à l'instar des autres, sur la poche distale, mais a ceci d'unique qu'elle contourne complètement la poche proximale. De plus, les substrats empruntant cette voie sont transportés sans phénomène de compétition vis-à-vis de ceux qui suivent les autres chemins d'accès.

Il y a donc trois voies d'accès au transporteur RND pour les substrats mais aussi trois conformères différents qui organisent leur efflux (figure 11).

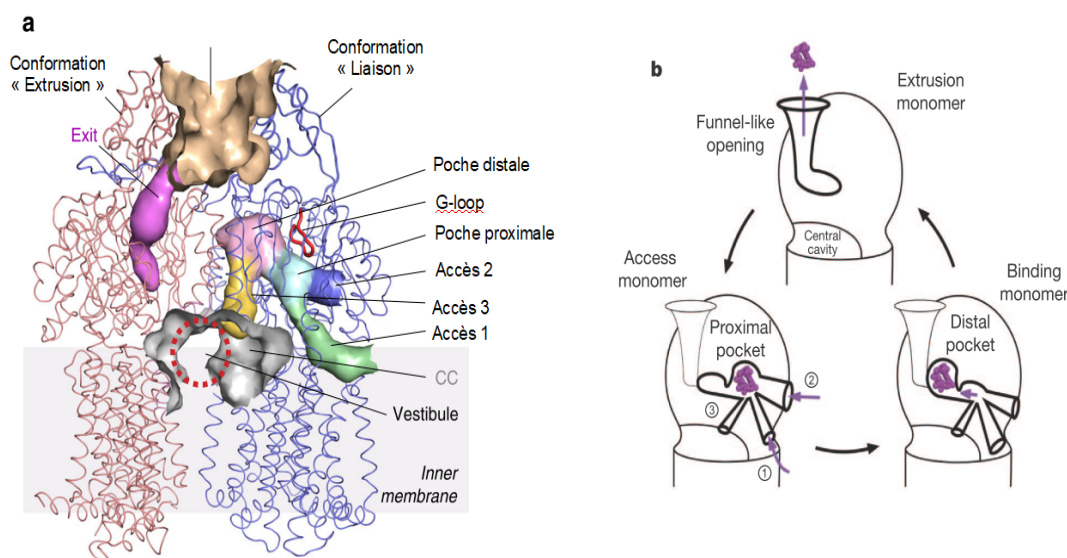


Figure 11 : Voies d'accès des substrats au transporteur RND. a) Présentation des différents canaux à l'intérieur de AcrB qui permettent l'acheminement des substrats vers la poche distale. Les accès 1 et 2 sont situés à proximité de la poche proximale tandis que l'accès 3 est connecté au vestibule et à la cavité centrale. Tous les accès disposent désormais d'une démonstration expérimentale et débouchent in fine sur la poche distale. b) Modèle schématique présentant les différentes voies d'accès dans un monomère de AcrB ainsi que le déplacement du substrat au cours du cycle d'efflux. Les substrats entrent dans la poche distale par une des trois voies d'accès dans la conformation « Accès », la

transition vers le conformère « Liaison » pousse le substrat dans la poche distale, enfin la transition vers le conformère « Extrusion » entraîne le relargage de la molécule et la fermeture des voies d'accès aux poches proximales et distales.

Le consensus actuel qui est le fruit d'au moins une décennie d'études structurales des transporteurs AcrB et MexB stipule qu'en absence de concentrations suffisantes en substrat le trimère se trouve dans une conformation symétrique, de repos, dans laquelle chacun des protomères adopte la conformation « accès ». En revanche, lorsque les concentrations en substrats le permettent, le transporteur RND devient asymétrique sous l'action d'un mouvement concerté de chacun de ses monomères suggérant un mécanisme de transport par changements conformationnels séquentiels et cycliques entre chacune des trois conformations possibles ; accès (A), fixation (T) et extrusion (E). La transition d'une conformation vers la suivante dans le cycle d'efflux permet de modifier les volumes internes accessibles au substrat au sein des domaines périplasmiques, le déplaçant progressivement vers le canal de l'OMF, tout en couplant le retour d'un proton vers le cytosol par le mouvement des hélices du domaine transmembranaire.

Ce modèle est connu sous le nom de mécanisme d'export péristaltique ou encore, par analogie avec la sous-unité F1 de l'ATP synthase, mécanisme de rotation fonctionnelle (Seeger 2006). Aux études structurales sont venues s'ajouter des études fonctionnelles *in vivo* qui confirment ce modèle (Seeger 2008). En particulier, l'ingénieuse démonstration de Takatsuka et Nikaido en 2009, ayant recours à une protéine de fusion qui associe sur un même gène les trois protomères de AcrB, a permis de contrôler précisément et de manière univoque l'état conformationnel d'un protomère sans affecter les deux autres au sein du trimère. Un protomère est muté de deux manières différentes : ou bien le relais à proton est inactivé par la mutation D407A ; ou bien des résidus cystéines sont introduits de sorte à empêcher l'accès

aux poches à substrats par formation d'un pont disulfure. Pour ces deux types de mutations, bien que le trimère disposât de deux protomères compétents pour l'efflux, la présence d'un troisième muté, inactiva le trimère tout entier. Cela prouve qu'il y a une nécessité fonctionnelle d'une alternance séquentielle de conformations de chacun des monomères au sein du trimère.

Au cours du cycle d'efflux le sous-domaine PN1/PC2 est peu modifié, présentant un RMSD inférieur à 0,5 Å, tandis que le sous-domaine PN2/PC1 subit un premier réarrangement conformationnel important lors de la transition A vers T, qui conduit à un RMSD de 2,0 Å, ainsi qu'un deuxième lors de la transition T vers E, avec un RMSD de 1,8 Å (Eicher 2014). Ces grandes variations sont le fait de mouvement à l'intérieur d'un sous-domaine, par exemple le déplacement de PN2 par rapport à PC1. Néanmoins, PN1/PC2 est de loin le sous-domaine le plus mobile, concerné par les mouvements les plus importants lors de la transition T vers E. De même, le domaine transmembranaire présente des variations structurales significatives d'un conformère à l'autre. Deux ensembles d'hélices bougent les unes en rapport des autres, pour un RMSD variant de 1,6 Å à 3,1 Å, mais conservent globalement leur structure propre, le premier (E1) contient les hélices TM1 et TM3 à TM6 et le deuxième (E2) se compose des hélices TM7 et TM9 à TM12. Chaque ensemble est adjoint à une hélice responsable de la transmission des changements conformationnels entre domaine périplasmique et domaine transmembranaire, TM2 et TM8 pour les ensembles E1 et E2 respectivement.

En définitive ce sont les mouvements engendrés par le domaine périplasmique lors de la liaison d'un substrat dans la poche distale, entraînant la transition A vers T, qui déclenchent un déplacement du sous-domaine PN2/PC1 qui réduit le volume interne de la poche proximale et

augmente celui de la poche distale, abaissant l'hélice TM2 dans la membrane ce qui cause un éloignement de l'ensemble E2. Le réseau de liaisons hydrogène permettant le transfert de protons se ferme au cytosol et s'ouvre au périplasma au cours de cette transition. Le passage du conformère T à E résulte en la protonation des aspartates D407 et D408 ce qui pousse le résidu K940 vers les hélices TM10 et TM11 permettant à TM2 de retrouver sa position initiale. Par voie de conséquence TM8 s'allonge vers le périplasma et entraîne le déplacement du sous-domaine PN1/PC2 vers le sous-domaine PN2/PC1 du même monomère. Ceci clos l'accès aux poches à substrat proximale et distale tout en ouvrant un chemin dans lequel la molécule à extruder peut se mouvoir pour atteindre l'OMF. Cette transition permet au canal à proton de s'ouvrir de nouveau au cytosol pour y relâcher un proton. Cette déprotonation est le moteur d'un retour à la conformation initiale, « accès ». Ce cycle, décrit ici pour un protomère, se produit de manière concertée entre chacun des trois monomères de sorte que la conformation à l'état stationnaire soit proche de A, T, E. Il est théoriquement possible d'envisager une multitude de combinaisons d'états conformationnels, tels que des systèmes T, T, E par exemple, mais il est difficile de les mettre en évidence de manière certaine dans un contexte physiologique et fonctionnel (Müller 2015). Il semble cependant qu'une configuration E, E, E soit impossible du fait de l'encombrement stérique qui en résulterait et qu'une configuration E, E, T conduise au désassemblage de la pompe à efflux. Un état T, T, T pourrait exister en présence de concentrations saturantes en substrats (figure 12).

Les transporteurs de ces pompes tripartites leur confèrent la capacité d'extruder de nombreux composés chimiquement et structuralement différents, tels que des détergents, des colorants et des antibiotiques (figure 13). Les substrats sont toujours des molécules amphiphiles qui possèdent parfois des charges, positives ou négatives, aux masses moléculaires très variables. Le potentiel d'efflux pour un si large spectre de molécules vient de

ce qu'il existe plusieurs voies d'accès et plusieurs sites de liaison distincts sur le transporteur, lui permettant d'accommoder plusieurs substrats. De plus, les volumes des poches à substrats sont suffisamment grands pour que la molécule transportée demeure solvatée par plusieurs molécules d'eau, qui se comportent comme un lubrifiant en masquant certains sites d'interaction défavorables entre la molécule et le transporteur (Vargiu 2012, 2018).

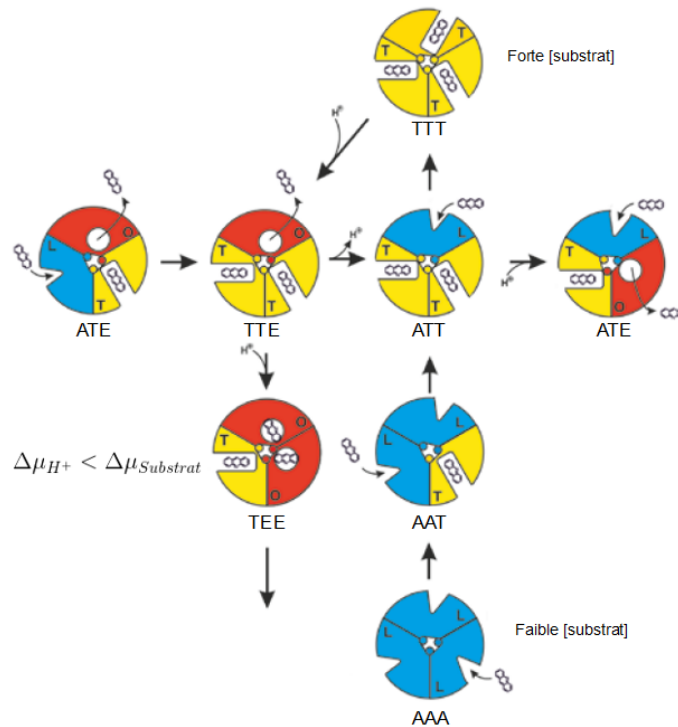


Figure 12 : Différentes configurations du trimère AcrB au cours du cycle d'efflux. Des cas limites existent qui favorisent certaines configurations, une faible concentration en substrat donne AAA, forte concentration en substrat TTT, des potentiels chimiques défavorables TEE qui conduit au désassemblage du complexe tripartite. (A, Accès ; T, Liaison ; E, Extrusion). Adapté de Müller 2015.

Cependant, il existe des molécules qui ne sont pas du tout prises en charge par les transporteurs RND mais aussi des inhibiteurs spécifiques tels que le PAβN (Lomovskaya 2000).



Bien que nous soyons intéressés par la propension de ces transporteurs à effluer des molécules à visée médicale, ils sont aussi utilisés par les bactéries pour diffuser dans le milieu des facteurs de pathogénicité ainsi que des molécules du quorum sensing favorisant la colonisation de leur hôte (Pidcock 2006).

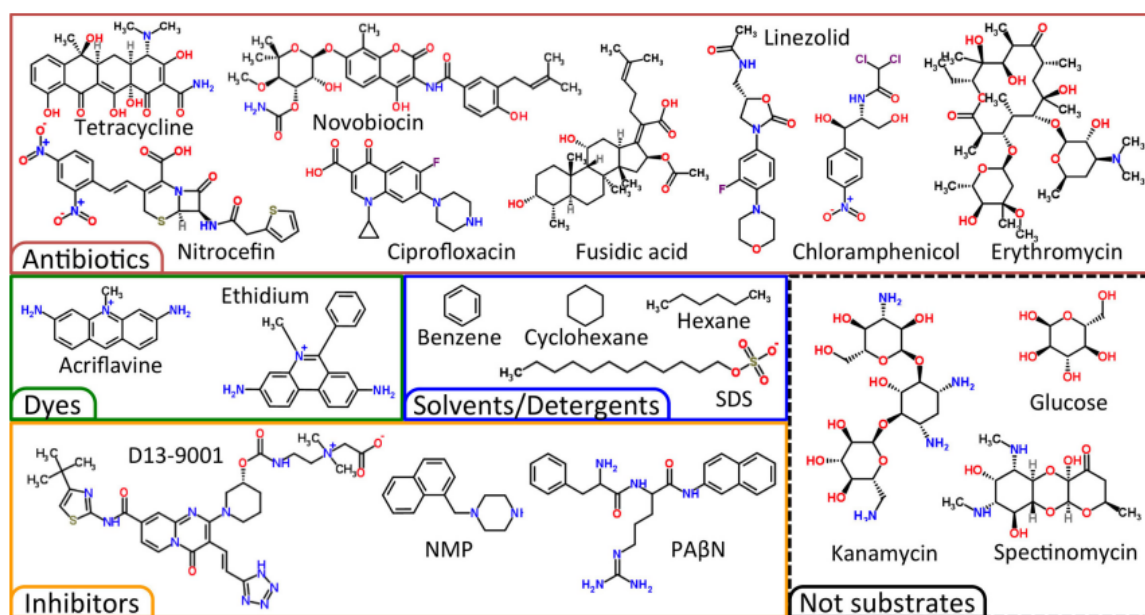


Figure 13 : AcrB présente une affinité pour un large spectre de molécules. Structures de quelques molécules d'intérêt effluées par AcrB, une grande diversité est présente qui explique le phénotype de multirésistance conféré par ces transporteurs : molécules hydrophobes (benzène, hexane), chargées négativement (SDS), chargées positivement (Acriflavine, bromure d'éthidium), de faible poids moléculaire et peu encombrante (cyclohexane), de haut poids moléculaire et présentant un grand volume (érythromycine). A titre de comparaison sont figurés des molécules qui ne sont pas substrats de AcrB et quelques inhibiteurs. (Ruggerone 2013)

## B.5 Assemblage du complexe tripartite

Connaissant les structures de chaque protéine impliquée dans le complexe, il est nécessaire de déterminer l'architecture précise du complexe tripartite qui reste sujette à questions. Deux modèles s'affrontent encore pour rationaliser les aspects structuraux de la construction tripartite ; le premier suppose une stœchiométrie 3:3:3 (RND : PAP : OMF) et une longueur totale de 27 nm (Symmons 2009) tandis que le second propose une stœchiométrie 3:6:3 (RND : PAP : OMF) pour une longueur de 32 nm (Wang 2017). Il est crucial de déterminer la manière dont chaque partenaire s'agence au sein de la pompe afin de mieux comprendre son mécanisme d'action et ainsi espérer l'enrayer.

A cette fin des expériences de réticulation chimique au moyen de molécules espaceurs de 6,8 Å et 15,7 Å ont été réalisées *in vivo* pour déterminer les sites d'interactions possibles entre AcrA et TolC d'une part (Lobedanz 2007) puis AcrB et AcrA d'autre part (Symmons 2009). Celles-ci montrent qu'il existe des points de contact entre les domaines lipoyl et tonneau  $\beta$  d'AcrA et les sous domaines DC et DN de AcrB tandis que le domaine MP de AcrA interagit avec les sous-domaines PC1 et PN2 de AcrB. Enfin, les hélices  $\alpha$  de AcrA sont au contact des hélices H3 et H8 de TolC elles-mêmes insérées à leur extrémité entre les motifs  $\beta$  tige-boucle des sous-domaines DN et DC de AcrB. Le modèle proposé par Symmons (figure 14) conduit à une distance intermembranaire de 17 nm avec un contact protéine-protéine direct entre l'OMF et son transporteur RND pour une stœchiométrie de 3:3:3 (OMF : PAP : RND).

De tels contacts sont aussi suggérés par des résultats de réticulation chimique entre TolC et des mutants de AcrB au niveau de ses motifs  $\beta$  tige-boucle dans le domaine d'ancrage à

l'OMF (Weeks et al., 2014). En effet, la délétion de ces motifs permet de copurifier un complexe AcrAB alors que la protéine native permet de copurifier le complexe tripartite entier. De plus, l'expression de AcrB avec un mutant de TolC, instable, qui est donc dégradé rapidement s'il n'est pas impliqué dans un complexe protéique, permet de purifier trois fois plus de TolC qu'en l'absence du transporteur, suggérant qu'il existe bien un bipartite AcrB-TolC. Enfin, il a été possible de former des ponts disulfures *in vivo* entre AcrB et TolC dans lesquels des cystéines avaient été introduites par mutagenèse dirigée (Tamura 2005). Ces liaisons covalentes se formaient entre les boucles du domaine DN de AcrB et les boucles de l'extrémité périplasmique de TolC. Il est aussi possible de purifier des complexes AcrA-TolC et AcrB-TolC après réticulation au moyen de DSP qui possède un bras espaceur d'une longueur de 1,2nm, impliquant une nouvelle fois une proximité entre OMF et transporteur RND (Touze 2004). Par ailleurs, la fixation de TolC sur AcrB a pu être détectée par Résonance Plasmonique de Surface (SPR) donnant une constante de dissociation de 90nM à pH6 (Tikhonova 2011). La modélisation moléculaire de TolC et du domaine d'ancrage à l'OMF de AcrB admet qu'une interaction directe entre ces deux protéines est à la fois possible et stable sur l'intervalle utilisé pour la simulation, soit entre 100ns et 1,05 $\mu$ s (Schmidt 2016).

En support à ce modèle d'assemblage vint la découverte d'un système d'efflux homologue à AcrAB-TolC chez *Borrelia burgdorferi*, nommé BesABC, et chez lequel la PAP est raccourcie (figure 15). En effet, cette dernière n'arbore qu'une boucle de huit acides aminés en l'endroit où les autres PAP exhibent généralement deux hélices organisées en structure tige-boucle de plus de soixante acides aminés (Greene 2013). Du fait de sa taille réduite cette PAP impose que transporteur RND et OMF soient en contact sans quoi il n'y aurait plus de canal continu traversant l'enveloppe bactérienne au moyen duquel effluer les substrats hors de la cellule, sauf à suggérer que les dimensions du périplasme de cette espèce soient environ 5nm

inférieures à celles des autres bactéries gram-négatif.

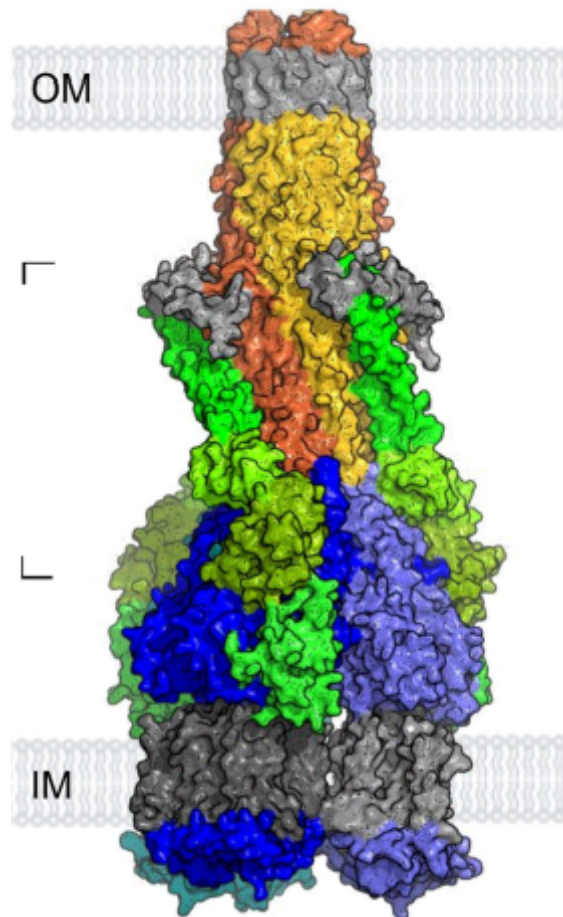


Figure 14 : Modèle structural (court) du complexe AcrAB-TolC (Symmons 2009). Modélisation du complexe à partir des résultats de réticulation chimique entre AcrA-TolC et AcrA-AcrB. La stœchiométrie du complexe tripartite est de 3:3:3 MexA:TolC:AcrB. Il y a un contact direct entre l'OMF et son transporteur pour une distance intermembranaire de 17 nm.

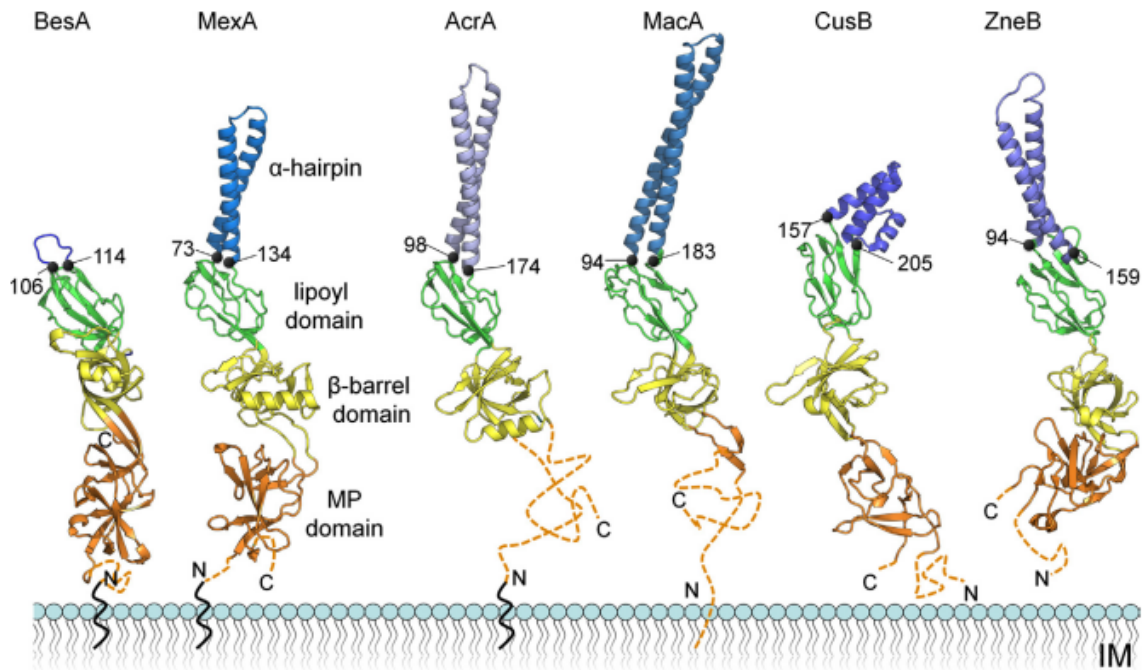


Figure 15 : Comparaison des structures de PAP impliquées dans différents assemblages tripartites. Les domaines lipoyl en vert, tonneau  $\beta$  en jaune et Membrane Proximal en orange se retrouvent chez chacune des PAP. En revanche, de fortes variations de la structure en hélice sont observées. À l'exception de CusB qui possède trois hélices de courte taille, MexA, AcrA, MacA et ZneB arborent deux hélices en tige-boucle avoisinant les 5nm de longueur. Par contraste, BesA n'a qu'une boucle de huit acides aminés ce qui pose question quant à son rôle structural dans l'assemblage tripartite. À noter, la présence d'une ancre lipidique pour BesA, MexA et AcrA, d'une hélice transmembranaire dans le cas de MacA (Greene 2013).

Dans ce modèle d'assemblage tripartite, c'est le transporteur RND qui déclenche l'ouverture du canal de l'OMF par déplacement des hélices H7/H8 de ce dernier lors de leur interaction avec les structures en tige-boucle du domaine d'ancrage du transporteur. Le faisceau d'hélices H7/H8 effectue une rotation autour de ce qui s'apparente à un stator, le faisceau d'hélices H3/H4, dans un mouvement qui ressemble à celui qu'un iris décrit lors de sa dilatation. Ce réarrangement conformationnel permet à la PAP de venir se lier à l'OMF au niveau des hélices H3/H8. Pour autant, l'anneau de constriction formé par les résidus D374 de

TolC n'est pas affecté et requiert vraisemblablement un recours supplémentaire de la PAP afin d'accomplir un relâchement complet du canal (Bavro 2008). Dans ce sens, une mutation unique de l'acide aminé K383D de TolC ou bien D194K de AcrA, qui conduit à une inversion de charge, empêche la formation du complexe tripartite. Ces deux acides aminés se trouvent pour l'un, proche du domaine équatorial de TolC sur l'hélice H8 et pour l'autre, environ à la moitié de l'hélice appartenant à la structure en tige boucle de AcrA. Il faut donc une interpénétration importante des deux protéines pour que ces résidus soient en contact, ce qui corrobore le modèle. Le double mutant autorise l'assemblage tripartite, et le favorise même par rapport au sauvage (Bavro 2008).

Afin de tester la fonctionnalité d'un tel assemblage *in vivo*, une protéine chimérique fusionnant le N-terminal de AcrA au C-terminal de AcrB auquel est ajoutée l'hélice TM7 du transporteur pour traverser la membrane interne, a été exprimée dans des souches délétées pour ces deux protéines (Hayashi 2016). Une stœchiométrie stricte 3:3 (RND: PAP) est ainsi assurée par le biais de cette construction chimérique et le positionnement de AcrA déterminé par la longueur du bras espaceur, parfois inexistant, contraint un arrangement conforme au modèle proposé par Symmons. Les mesures de MIC et de cinétique d'efflux du bromure d'éthidium montrent sans ambiguïté un fonctionnement comparable à celui du sauvage. Cette configuration interdit la formation d'un hexamère de PAP à cause de l'encombrement stérique qui en résulterait. De plus la délétion sans conséquences de l'homologue AcrE, capable de compléter une déficience en AcrA (Smith 2014), apporte un argument en faveur de la réalité des résultats précédents et affaiblit la possibilité d'une compensation apportée par des protéines endogènes.

Quelques considérations générales viennent encore à l'appui de ce modèle ; les peptides DARPin, utilisés pour stabiliser les contacts entre trimère de AcrB et favoriser sa cristallisation, sont aussi des inhibiteurs de la pompe (Senhauser 2006), or leur site de liaison à AcrB est distinct de celui de AcrA, mais proche des sous-domaines PC2/PN1 qui subissent des mouvements importants au cours du cycle d'efflux (figure 16). Ne gênant pas l'assemblage lui-même les DARPin pourraient donc enrayer le fonctionnement du transporteur en entravant le mouvement du sous-domaine PC2/PN1. A l'inverse, AcrA se liant au niveau du sous-domaine PC1/PN2 qui varie peu d'un conformère à l'autre, il n'entrave pas le fonctionnement du transporteur. Situé à proximité du vestibule, la PAP pourrait même jouer un rôle dans l'acheminement de certains substrats vers le transporteur à l'instar des systèmes tripartites effluant les métaux lourds (De Angelis 2010 et Su 2009).

Cependant, ce modèle fait débat. En effet, la purification par séparation sur gradient de saccharose des fractions contenant les membranes internes et externes révèle que AcrB se trouve toujours majoritairement dans les fractions de la membrane interne lorsque AcrA est absent tandis que AcrA ne voit pas sa répartition changer significativement selon les conditions expérimentales employées, se divisant en deux populations, une majoritaire dans la membrane interne et l'autre minoritaire dans la membrane externe (Tikhonova 2004). De même, des pontages par l'agent DSP permettent de copurifier un bipartite AcrA-TolC même en absence de substrat et de AcrB (Husain 2004). Ces résultats indiquent que le complexe bipartite AcrB-TolC a une faible affinité ou bien n'existe pas alors que la PAP peut interagir avec l'OMF en dehors du complexe tripartite. A ce titre, des mesures concernant la thermodynamique de l'association entre les différents partenaires ont été réalisées par ITC. Celles-ci n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre AcrB et TolC (Touze 2004).

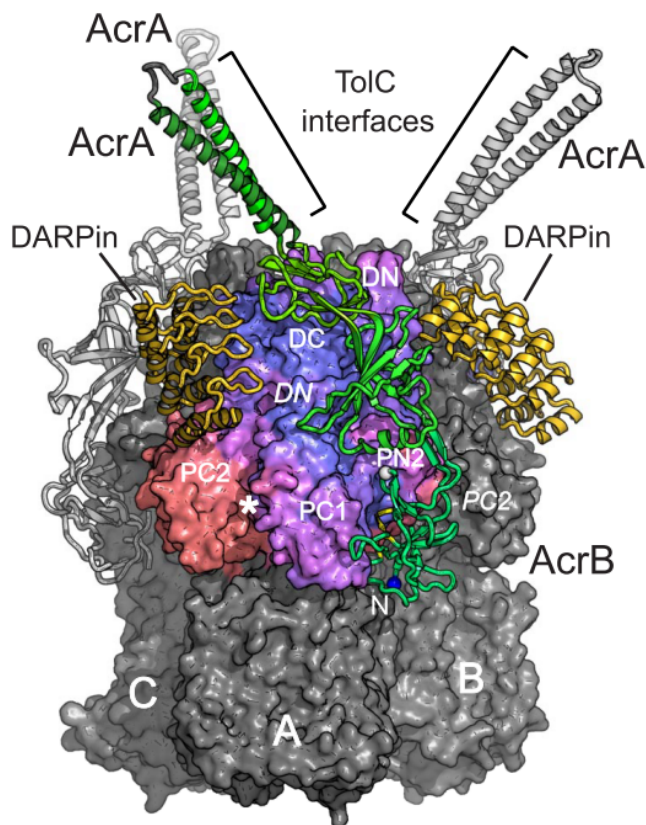


Figure 16 : Comparaison des interfaces de AcrB concernées par la liaison de AcrA et des DARPin. AcrA se situe essentiellement entre PC1/PN2, sous-domaines dont la conformation varie peu au cours du cycle d'efflux alors que les DARPin se fixent sur les sous-domaines PC2/DN dont les mouvements importants sont nécessaires au fonctionnement du transporteur. (Symmons 2009).

Il fut néanmoins possible de mesurer une association entre AcrA sans sa modification post-traductionnelle et TolC, en quatre phases distinctes d'une affinité maximum de 2  $\mu\text{M}$ . Ce même AcrA présenta aussi une affinité pour AcrB, selon un modèle biphasique d'affinités 17  $\mu\text{M}$  et 0,4  $\mu\text{M}$ . Les résultats précédents sont corroborés par les mesures d'interaction en SPR (Tikhonova 2011). Ici, seul le AcrA palmitoylé permet de former un complexe avec AcrB immobilisé sur le senseur, suivant une cinétique d'association complexe au cours de laquelle deux phases se succèdent, indiquant selon les auteurs la nécessité d'un réarrangement conformationnel. Lors de ces expériences, il a aussi été mis en évidence que AcrA peut se lier



à TolC mais que l'affinité de cette interaction diminue si l'OMF est maintenue partiellement ouverte par des mutations de certains acides aminés clés. Les affinités caractérisant la formation de ces deux complexes bipartites sont proches, de l'ordre de 90 nM. Bien qu'ils aient tenté de quantifier les paramètres de la formation du complexe tripartite, les résultats expérimentaux ne sont pas suffisamment clairs et les auteurs ne peuvent conclure mais notent tout de même qu'ils sont capables de détecter et suivre la formation de la pompe. Il faut préciser que les résultats de cette étude ont été obtenus à pH 6, proche de celui qui existe dans le périplasme, car un pH de 7,5 tel que classiquement utilisé en biologie ne permettait pas de détecter quelque association que ce soit.

Au-delà du seul aspect des interactions protéine-protéine, c'est aussi la stœchiométrie du complexe qui a finalement été remise en question avec l'observation d'organisations multimériques chez plusieurs homologues différents appartenant à la famille des PAP, argumentant en faveur d'un ratio molaire au sein du complexe tripartite de 3:6:3 (RND : PAP : OMF). Premièrement, de nombreuses études ont révélé une propension évidente à la dimérisation et l'hexamérisation de ces protéines tel que décrit précédemment. De plus, lorsque des protéines de fusion sont exprimées *in cellulo* qui contraignent la formation de dimères de PAP, des activités d'efflux et MIC comparables au sauvage sont mesurés (Xu 2011). Aussi est-il possible de purifier après réticulation chimique des complexes AcrAB sur lesquels sont stabilisés deux monomères de AcrA (Zgurskaya 2000). Enfin, les travaux de Ferrandez, en 2012, consistant en la reconstitution de complexes OprM-MexA consécutivement analysés sur gel BN-PAGE afin de préserver les conditions natives des complexes formés, indiquent plutôt que des dimères de MexA sont liés à un trimère de OprM. En effet, les stœchiométries rendant compte des masses moléculaires déterminées pour les différentes bandes obtenues sur le gel BN-PAGE varient de 2:1 à plus de 8:1 par incrément de

deux pour le complexe MexA:OprM.

*In fine*, la visualisation de différents complexes par des techniques de cryo-microscopie électronique sur particules uniques et de diffraction des rayons X par des cristaux ont achevé de confirmer qu'un assemblage différent à celui proposé par Symmons (2009) est possible (figure 17). Les PAP cristallisent sous forme d'hexamère et d'heptamère (figure 17C) tandis que le complexe CusAB, où CusA est l'homologue de AcrB et CusB l'homologue de AcrA, forme des cristaux présentant un transporteur RND trimérique sur lequel s'appuie un hexamère de PAP (Su 2011). Seul complexe cristallisable à ce jour concernant la famille des pompes à efflux, ce bipartite décrit des zones de contacts étendues entre domaines lipoyl et tonneau  $\beta$  des PAP (figure 17A). En particulier, les domaines lipoyl se situent au dessus de l'extrémité périplasmique du transporteur RND et avec le concours des hélices, inclinées d'environ  $90^\circ$  et accolées les unes aux autres, forment un tube qui peut venir en continuité du canal de l'OMF. Des bipartites OMF-PAP ont aussi été observés, par microscopie électronique cette fois (Trépout 2010), révélant qu'une interaction entre OMF et hexamère de PAP est possible (figure 17B). Des premiers travaux ont pu montrer qu'une protéine chimérique qui remplaçait les extrémités des hélices de MacA par celles de TolC formait un canal ouvert par interaction avec une autre protéine chimérique, la PAP MacA dans laquelle les hélices en tige boucle sont entièrement remplacées par celles de AcrA (Xu 2011 et figure 17D). D'autres travaux consistant en la reconstitution en liposomes des protéines OprM et MexA a permis l'observation par tomographie en cryo-ME de complexes bipartites. Bien que la structure précise de ces derniers n'ait pu être déterminée, la distance inter-membranaire de 21 nm suggère que les PAP se positionnent à l'extrémité de l'OMF, selon un mode d'interaction dit bout-à-bout (Trépout 2010). Celui-ci stipule que PAP et OMF interagissent principalement par les boucles connectant leur différents faisceaux d'hélices respectifs mais que les hélices elles-

mêmes ne contribuent qu'à la stabilisation de l'hexamère de PAP et celle de la conformation ouverte de l'OMF, excluant tout recouvrement ou interpénétration des hélices comme le proposait le modèle de Symmons (2009). L'analyse de la conservation des acides aminés des séquences des PAP au cours de l'évolution ainsi que des expériences de mutagenèse dirigée au niveau des extrémités des hélices des PAP, allant jusqu'au remplacement de la séquence d'une PAP par celle d'une autre, ont démontré l'importance de ces segments peptidiques dans l'interaction entre OMF et PAP (Kim 2010, Xu 2010, Xu 2011).

Un tel arrangement a depuis été largement confirmé par une série de travaux sur les complexes tripartites AcrAB-TolC d'*E. coli* et MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Pour le premier, le recours à des protéines de fusion a permis de construire un complexe fonctionnel *in vivo*, constitué par les protéines AcrAB, AcrAZ et TolC. Ici, six monomères de AcrA sont disponibles pour former le complexe tripartite, trois proviennent du transporteur RND, localisés proche des sous-domaines PC2/PN1, et les trois autres apportés par AcrZ et situés proches des domaines PC1/PN2. Les complexes sont purifiés par le biais d'une étiquette histidine après lyse bactérienne puis observés en cryo-ME (Du 2014). Pour le second, qui concerne un travail réalisé par l'équipe, les protéines du transporteur, de l'OMF et la PAP sont surexprimées et purifiées individuellement. Ensuite, le transporteur et l'OMF sont stabilisés en phase aqueuse par reconstitution en nanodisque puis la PAP est ajoutée en détergent.

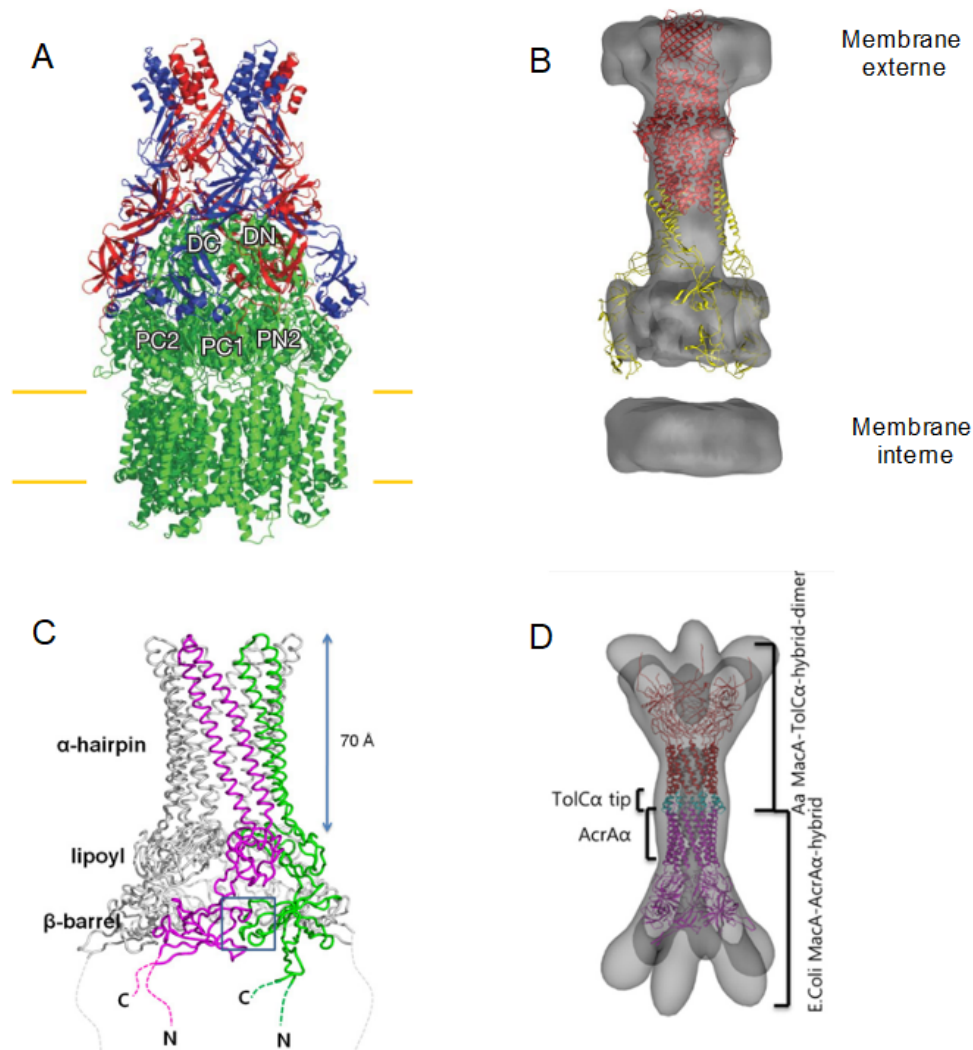


Figure 17 : Les PAP forment des hexamères impliquant une stœchiométrie du complexe 3:6:3. A- Structure cristallographique de CusAB dans laquelle les PAP CusB sont arrangées en hexamère par l'interaction de leurs domaines lipoyl et hélice en tige boucle (Su 2011). B- Volume de densité obtenu par tomographie cryo-ME pour les assemblages bipartites OprM-MexA. Il n'est possible de faire correspondre les structures cristallographiques des deux protéines avec le volume 3D que pour une stœchiométrie 3:6 et un contact bout-à-bout. (Trépot 2010). C- Structure cristallographique de la PAP MacA (3FPP), organisée en hexamère (Yum 2009). D- Remplacement de la carte de densité obtenue par cryo-ME par un modèle atomique pour le complexe entre MacA chimériques dont les extrémités hélicoïdales sont remplacées par celles de AcrA et TolC. Similaire à ce que suggère B, un hexamère de MacA résultant d'interactions entre les portions d'hélice de AcrA permet la liaison aux extrémités tige boucles de TolC (Xu 2011).

Le complexe tripartite se forme spontanément après une période d'incubation, puis il est observé par ME en coloration négative (Daury 2016). Dans les deux cas, les complexes tripartites observés ont des structures similaires (figure 18). Contrairement au modèle proposé par Symmons (2009), il n'y a pas de contact direct entre le transporteur et son OMF mais à l'instar du complexe CusAB, un hexamère de PAP vient prolonger le canal formé par l'OMF ouverte selon un contact de type bout-à-bout. L'hexamère de PAP n'a pas de symétrie 6 stricte, chaque monomère étant distinct des deux autres qui l'entourent. Ces complexes s'étendent sur 23 nm dans le périplasme, soit 6 nm de plus que le modèle de Symmons et témoignent de la différence significative qui existe entre eux.

Néanmoins, cette organisation structurale est séduisante par la logique fonctionnelle qu'elle sous-tend. Chaque partenaire du complexe a une fonction évidente, bien définie et intimement liée à sa structure, la pseudo-symétrie d'ordre deux observée pour chacune des protéines impliquées dans le complexe tripartite est exploitée par la PAP dont chacune des sous-unités du dimère interagit avec une moitié distincte du transporteur RND comme de l'OMF, et le canal d'efflux résultant de la jonction OMF-PAP est ici imperméable n'offrant aucune possibilité de fuite du substrat ni aucun transport retour. Enfin, la grande analogie structurale qui existe entre les structures de MexAB-OprM, AcrABZ-TolC et MacAB-TolC, a l'avantage de postuler un mode d'organisation structurale simple et général, conservé au travers de familles de transporteurs différentes ainsi que d'espèces bactériennes divergentes.

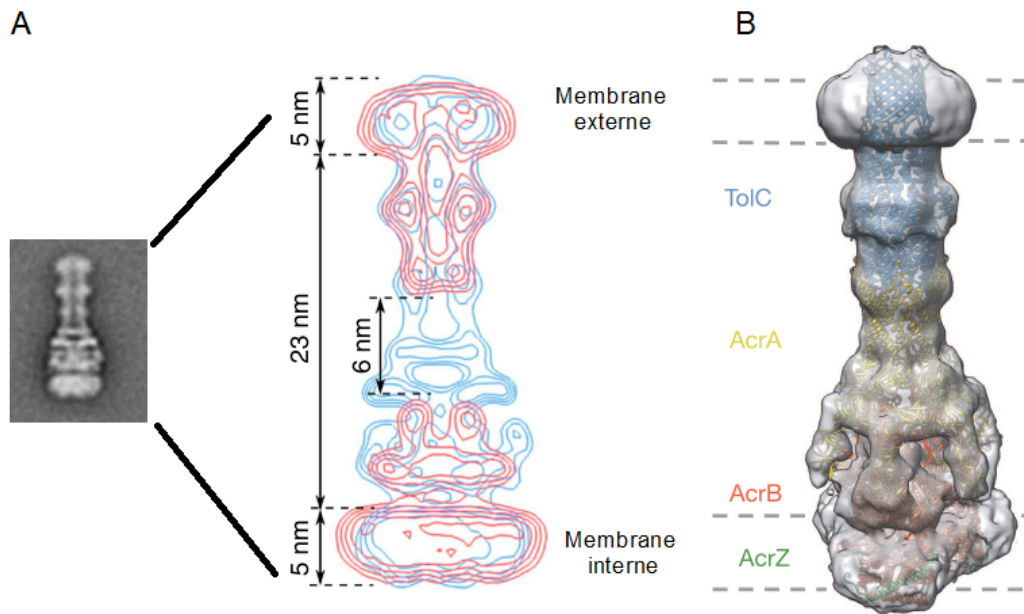


Figure 18 : Modèles structuraux (long) des complexes tripartites MexAB-OprM et AcrABZ-TolC. A- Les observations par ME en coloration négative des assemblages MexAB-OprM *in vitro* stabilisés par des nanodisques permet la réalisation d'une image moyenne. Celle-ci révèle un complexe sans contact direct entre l'OMF et sont transporteur, comblé par la PAP hexamérique pour une distance intermembranaire de 23 nm (Daury 2016). B- Reconstruction d'un modèle atomique AcrABZ-TolC à partir d'une carte de densité 3D obtenue par des observations de cryo-ME. Stoechiométrie 3:6:3 AcrB:AcrA:TolC sans contact direct AcrB-TolC et distance intermembranaire de 23 nm (Du 2014).

## B.6 Désassemblage du complexe tripartite.

Si la structure exacte des pompes à efflux demeure encore sujet à débats, le processus de désassemblage est parfaitement établi. L'étude *in vivo* d'un complexe RND tripartite homologue à MexAB-OprM chez *Neisseria gonorrhoeae*, MtrCDE, a montré l'importance du gradient de protons pour déclencher le désassemblage du complexe (Janganan 2013). Ce résultat est corroboré par les expériences *in vitro* de reconstitution de pompes à efflux du système MexAB-OprM entre liposomes (Enguéné 2015). Les protéines bipartites MexAB sont reconstituées dans un même liposome tandis que OprM est reconstituée à part (Figure 19). Le mélange de ces deux populations de liposomes aboutit à la formation de complexe dont l'activité d'efflux est mesurable par variation de fluorescence. En effet, la pyranine contenue dans les liposomes MexAB voit sa fluorescence diminuer du fait de l'acidification du lumen de ce liposome lorsque MexB est actif et permet le transfert de protons entre le milieu extérieur et la lumière du liposome. Concomitamment, la fluorescence du bromure d'éthidium, substrat de la pompe et transporté vers la lumière des liposomes OprM, augmente, puisqu'il s'intercale dans une molécule d'ARN. La purification des liposomes MexAB par affinité des lipides biotinylés qui les composent pour des billes recouvertes de streptavidine permet d'analyser sur gel SDS-PAGE leur contenu protéique. Lorsque le complexe tripartite a fonctionné, la bande correspondant à OprM est perdue, alors que s'il n'y a pas d'activité d'efflux, comme dans le cas où le mutant D407N de MexB est utilisé, la bande OprM est présente. Ceci confirme que le complexe tripartite se forme spontanément mais nécessite un apport d'énergie pour sa dissociation, qui intervient lors de son cycle catalytique.

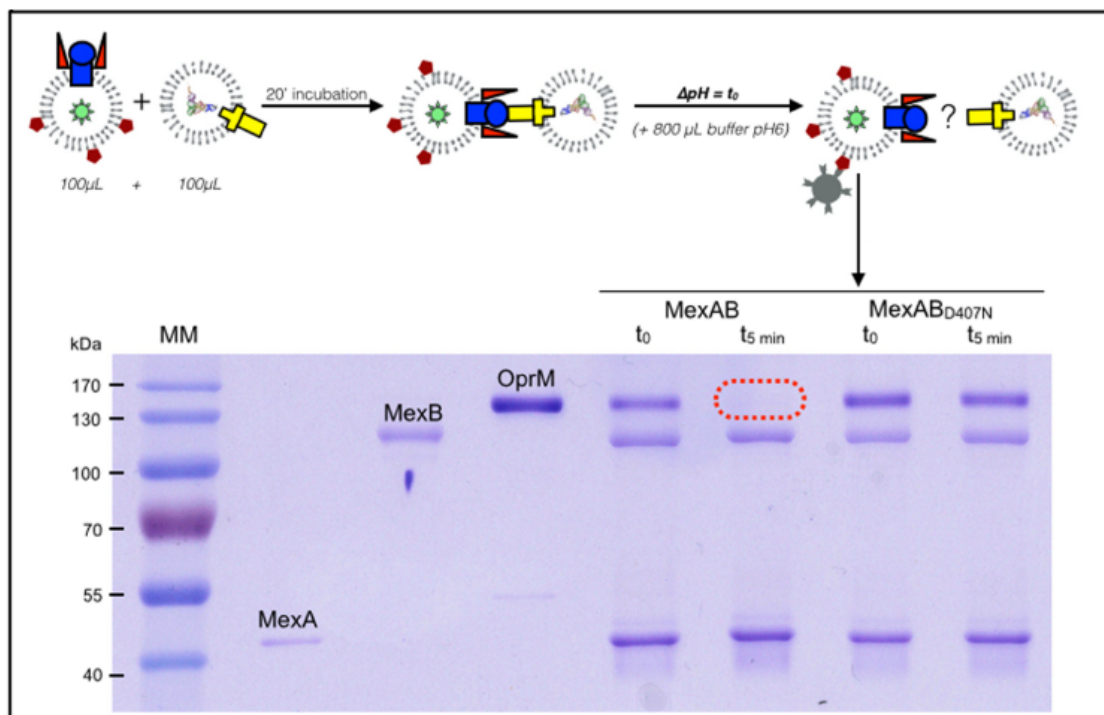


Figure 19 : Le désassemblage du complexe tripartite requiert un apport d'énergie. Le complexe MexAB est reconstitué dans un premier liposome tandis que OprM est reconstitué dans un second liposome. La présence de lipides biotinylés dans le liposome MexAB permet sa purification par affinité pour des billes streptavidine. Une analyse sur gel SDS-PAGE révèle la présence des trois protéines MexA, MexB et OprM, après incubation durant 20 minutes de ces deux types de liposomes (puits MexAB t<sub>0</sub>). Un complexe tripartite MexAB-OprM s'est donc formé et a rendu possible la co-purification de OprM avec les liposomes MexAB.

La constitution d'un gradient de protons par ajout d'acide entraîne le fonctionnement de la pompe puis les liposomes MexAB sont purifiés. Dans le cas où des protéines natives sont utilisées, le gel SDS-PAGE indique que seules les protéines MexA et MexB sont purifiées tandis que OprM est absente (puits MexAB t<sub>5min</sub>, cercle rouge). En revanche, si un mutant de MexB insensible au gradient de protons est utilisé, le complexe demeure intact (puits MexABD407N t<sub>5min</sub>). Ceci démontre que le fonctionnement de la pompe à efflux entraîne son désassemblage (Enguéne 2015).



## C) Stabilisation des protéines membranaires

Les protéines membranaires représentent environ 30% de l'ensemble des protéines codées par les génomes des organismes appartenant aux différents règnes du vivant (Wallin 1998 ; Krogh 2001). La présence de larges segments peptidiques hydrophobes qui les stabilisent dans la membrane biologique leur donne un caractère instable lorsqu'elles sont extraites des membranes lipidiques. En effet ces larges segments peptidiques hydrophobes sont non solubles dans l'eau, et ont tendance à se coller les uns aux autres et conduisent à l'agrégation des protéines au cours du temps. Pour pouvoir en étudier leur fonction à l'échelle moléculaire ainsi que leur structure, il est nécessaire de recréer un environnement mimant la membrane biologique en recourant à l'utilisation de molécules amphiphiles aux propriétés particulières pour extraire ces protéines des membranes biologiques et pour garantir leur solubilité dans un solvant aqueux. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour satisfaire ces critères dont certaines sont décrites ci-dessous.

### C.1 Détergents

Les détergents sont des molécules amphiphiles dont les propriétés structurales rappellent celles des lipides qui composent les membranes biologiques. Ils disposent comme eux d'une tête polaire qui les rend solubles dans l'eau, ainsi qu'une unique queue hydrophobe, au contraire des deux présentes dans un lipide, pour interagir avec les segments peptidiques hydrophobes. Pour ces molécules, le ratio des volumes occupés par les queues hydrophobes vis-à-vis du produit de leur longueur par la surface des têtes hydrophiles, constitue le paramètre de forme (CPP, Critical Packing Parameter), et décrit en première approximation les structures obtenues par assemblage de ces molécules (Mouritsen 2011). Les lipides ayant un CPP proche de 1 forment des bicouches lipidiques alors que les détergents ont des CPP

inférieures à  $1/3$  résultant en la formation de micelles. La forme générale d'une molécule de détergent, en cône inversé, justifie qu'ils soient en mesure de s'insérer dans les membranes et progressivement les déstabiliser pour finalement les solubiliser (Figure 20).

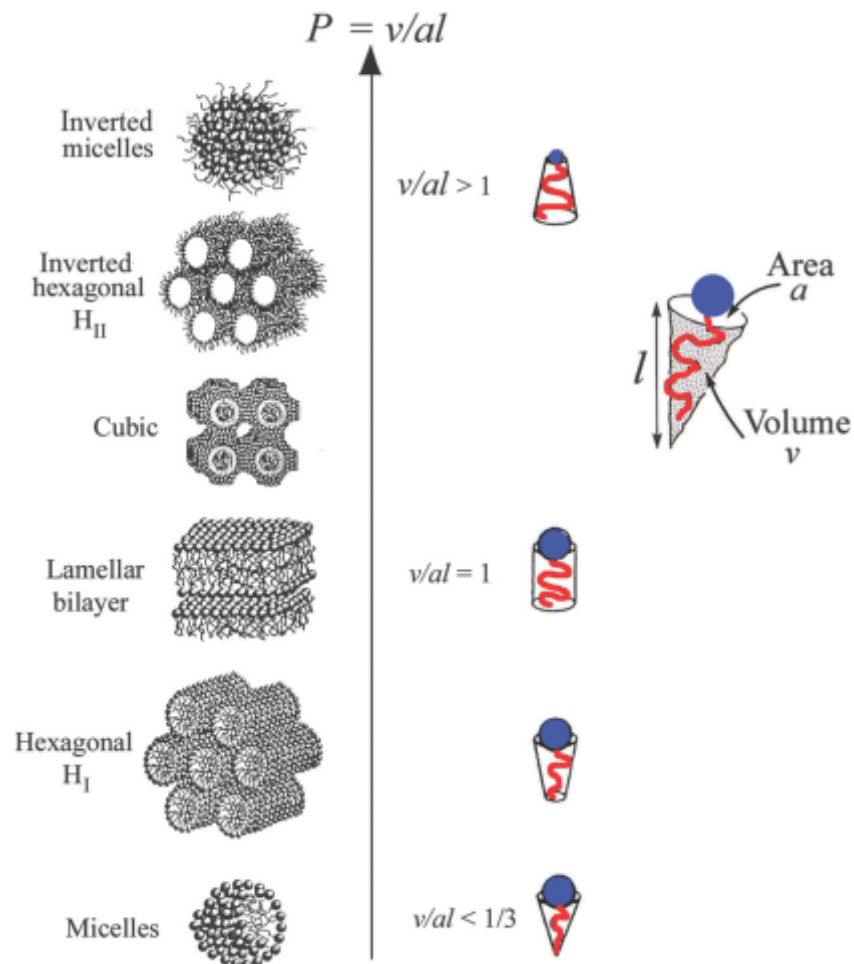


Figure 20 : Le paramètre de forme CPP détermine l'auto-association des lipides et détergents en des phases aux structures différentes. Lorsque le CPP est inférieur à  $1/3$ , la tête polaire est beaucoup plus volumineuse que les chaînes hydrophobes et promeut la formation de micelles, structures sphériques qui exposent leurs têtes polaires vers le milieu extérieur et concentrent leurs chaînes hydrophobes à l'intérieur ; c'est le cas des détergents. Un CPP égal à 1 représente le cas des lipides tels que POPC, et favorise une organisation lamellaire en bicouche. Le cas CPP supérieur à 1 est illustré par les lipides POPE qui introduisent des courbures dans les membranes. Adapté de Mouritsen 2011.

Les propriétés physico-chimiques des molécules de détergent entraînent un comportement particulier dépendant de leur concentration en solution et caractérisé par la Concentration Micellaire Critique (CMC). En dessous de cette concentration, les molécules de détergent sont dispersées sous forme de monomères ; au dessus de la CMC, en revanche, les monomères de détergent s'auto-assemblent pour former des micelles, dont l'intérieur est hydrophobe et l'extérieur présente les têtes polaires hydrophiles. L'utilisation de concentrations supérieures à la CMC permet donc de stabiliser en phase aqueuse des protéines par la formation d'une micelle de détergent autour des parties hydrophobes de la protéine (le Maire 2000).

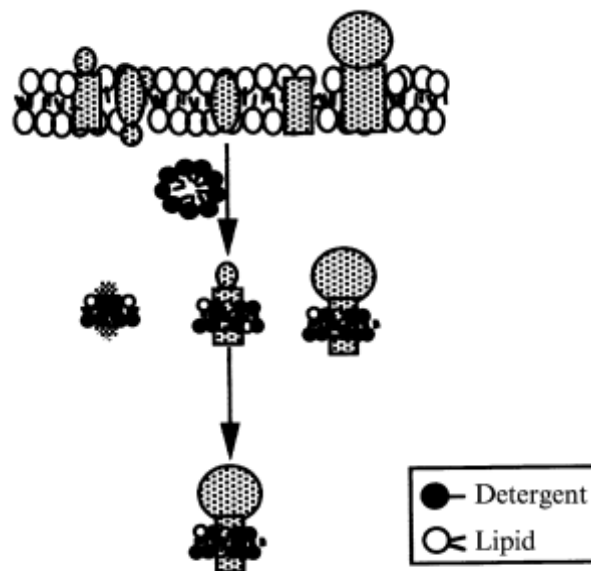


Figure 21 : Solubilisation des protéines membranaires par un détergent. L'augmentation de la concentration en détergent au delà de sa CMC permet la formation de micelles qui, en présence de membrane, sont en mesure d'extraire lipides et protéines qui s'y trouvent pour former des micelles mixtes. Adapté de Rigaud 2003.

Les détergents sont aussi employés couramment dans les protocoles de purification des protéines membranaires à des concentrations parfois dix fois supérieures à leur CMC puisqu'ils permettent de solubiliser les membranes, et donc les protéines qui s'y trouvent (Figure 21). Cette solubilisation membranaire se fait en trois étapes selon un gradient croissant de concentration en détergent ; une première étape durant laquelle les monomères de détergent se partitionnent entre phase aqueuse et membrane ; une deuxième étape qui se déclenche lorsque la membrane est saturée en détergent (caractérisée par une valeur,  $R_{sat}$ , de la fraction molaire de détergent dans la membrane) et qu'une transition s'opère depuis la phase lamellaire (bicouche membranaire) vers une population de micelles saturées en détergent ou en lipides ; enfin une dernière étape, la solubilisation, qui voit la constitution de micelles mixtes lipides-détergent (caractérisée par  $R_{sol}$ , fraction molaire de détergent dans les micelles) (Rigaud 1995). La solubilisation membranaire s'accompagne d'une solubilisation des molécules qui s'y trouvent insérées telles que les protéines.

Il existe plusieurs centaines de détergents qui diffèrent par les structures de leurs têtes polaires et de leurs queues hydrophobes, dont chacun présente des propriétés de solubilisation ou de stabilisation qui varient selon la protéine étudiée ainsi que les conditions expérimentales employées (Figure 22). Il est possible de distinguer trois grandes familles de détergents en fonction de la charge nette portée par leur tête hydrophile. Les détergents non-ioniques tels que le dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) et l'octyl- $\beta$ -D-glucoside (OG) sont généralement décrits comme « doux » en ce sens qu'ils solubilisent efficacement les membranes en déstabilisant les interactions lipides-lipides et lipides-protéines sans affecter les interactions protéines-protéines. Ils sont donc particulièrement bien indiqués pour travailler avec des protéines dont l'activité peut être rapidement perdue en présence de détergent. La digitonine par exemple, permet même d'isoler des super-complexes membranaires de la chaîne respiratoire (Schägger

2002). Les détergents anioniques tels que le sodium dodécyl sulfate (SDS) ou le cholate présentent une charge négative permanente sur leur tête polaire tandis que les détergents cationiques possèdent une charge positive permanente par l'intermédiaire d'un ammonium quaternaire sur leur tête polaire. Ces détergents ioniques ont l'inconvénient de pouvoir dénaturer les protéines. Enfin les détergents zwitterioniques tels que le CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) ont une charge nette nulle au niveau de leur tête polaire qui résulte de la présence de plusieurs groupements chargés de signes opposés.

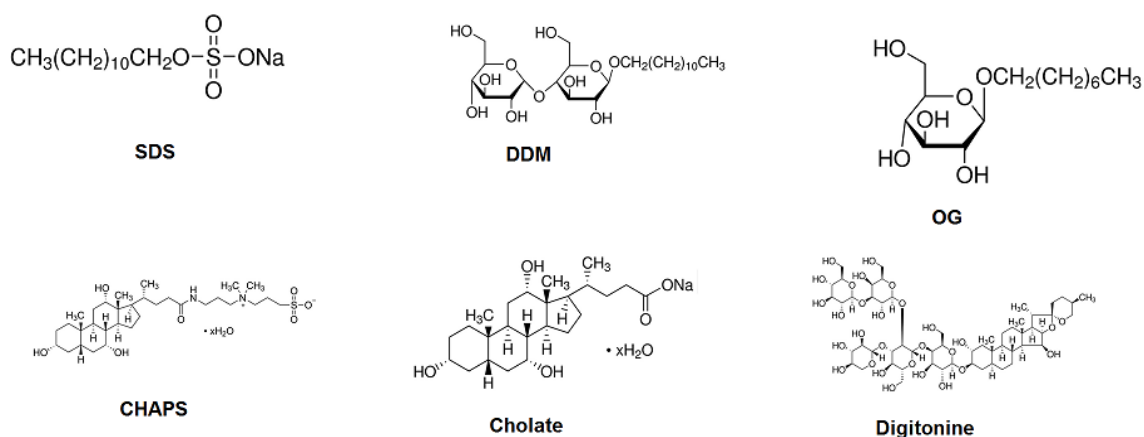


Figure 22 : Structure de quelques détergents courants. Les détergents sont divers par leurs structures, les charges de leur tête polaire et leurs propriétés physico-chimiques.

A noter que de nouveaux détergents apparaissent sur le marché avec des propriétés permettant de mieux stabiliser les protéines. Pour exemple les détergents calixaréniques dont l'originalité repose sur l'incorporation de fonctions carboxylates qui confèrent à cette famille de détergent de nouvelles interactions de type ionique diminuant l'échange de détergents dans le complexe avec la protéine (Suwinska 2008).

Malgré leur grande utilité pour la purification et la stabilisation de protéines membranaires, les détergents peuvent posséder des propriétés chaotropiques, c'est-à-dire

favorisant un état non replié de la protéine, et sont généralement des molécules imparfaites ne garantissant la stabilité colloïdale des protéines que sur des temps courts et pour des températures basses très inférieures à la température ambiante parfois nécessaire aux expériences biophysiques envisagées pour ces systèmes.

## C.2 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques de taille comprise entre quelques dizaines de nanomètres (pour les SUVs «small unilamellar vesicles»), d'environ 100-200 nm (pour les LUVs «large unilamellar vesicles) jusqu'à plusieurs microns (pour les GUVs «giant unilamellar vesicles»). Ces vésicules sont constituées d'une bicouche lipidique qui délimite un compartiment interne aqueux et le milieu externe de la solution, à la manière des cellules vivantes. Le processus de reconstitution de la protéine membranaire en liposome décrit ci-dessous permet d'insérer la protéine dans un liposome dont la taille sera proche de celle des LUVs (Figure 23). La protéine membranaire d'intérêt solubilisée en détergent est mise en présence de lipides et d'un excès de détergent, ce dernier est progressivement éliminé de la solution de sorte que sa concentration passe en deçà de sa CMC entraînant la formation de protéoliposomes (Rigaud 2003). Plusieurs techniques permettent le retrait du détergent. La dialyse consiste à laisser un équilibre de diffusion s'installer entre un faible volume du mélange de reconstitution contenu dans une membrane poreuse et un large excès de solution dépourvue de détergent. Si la taille des pores de la membrane est supérieure à celle des monomères de détergents ceux-ci la traversent entraînant une diminution de la concentration du détergent dans le mélange de reconstitution. Cette méthode n'est applicable que pour les détergents possédant une CMC élevée pour lesquels le retrait de détergent se produit en quelques heures. Des méthodes plus rapides sont aussi envisageables telles que la simple

dilution du mélange de reconstitution ou le passage sur une colonne d'exclusion stérique. Dernièrement, la commercialisation de billes de polystyrène (BioBeads SM-2) qui adsorbent le détergent ont rendu le retrait de détergent plus simple, plus rapide et reproductible, tout en l'étendant aux détergents caractérisés par des CMC faibles.

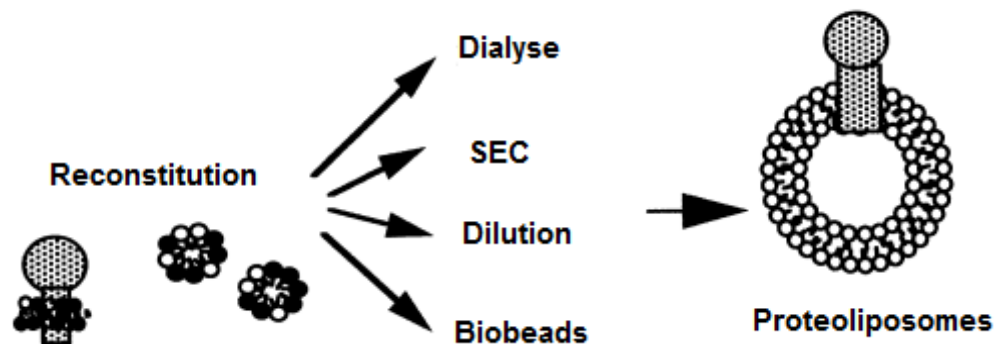


Figure 23 : La reconstitution d'une protéine membranaire peut se faire par plusieurs techniques. La protéines d'intérêt pure dans son détergent est mise en présence de lipides. Différentes méthodes permettent ensuite de retirer le détergent de sorte que sa concentration finale soit inférieure à sa CMC, déclenchant le processus de reconstitution et la formation de protéoliposomes (Rigaud 2003).

Les protéoliposomes formés à partir de micelles ternaires lipide/détergent/protéine ne permettent pas de contrôler l'orientation des protéines dans la membrane. Une manière d'en contrôler l'orientation est de procéder par une insertion directe des protéines membranaires dans des liposomes déjà constitués. Pour cela, une quantité de détergent suffisante est ajoutée à un solution de liposomes préformés de sorte que la concentration finale en détergent soit comprise entre  $R_{sat}$  et  $R_{sol}$ . Après incubation avec la protéine d'intérêt et retrait du détergent au moyen des BioBeads, une solution de protéoliposomes est obtenue. Cette approche permet de favoriser une certaine orientation des protéines dans la membrane en contrôlant la quantité de détergent ajouté, qui doit être proche de  $R_{sat}$ . Dans ce cas en effet, les protéines doivent,

pour s'insérer dans les liposomes, présenter en premier leurs segments hydrophobes, et de plus, ces derniers étant suffisamment structurés, ils stabiliseront la protéine dans le liposome avec une seule orientation.

Les liposomes présentent un intérêt particulier pour les études fonctionnelles de transporteurs membranaires dans la mesure où ils permettent de simuler un espace cytoplasmique de composition différente du milieu extérieur. Ceci autorise la formation et l'utilisation de gradients électrochimiques au travers de leur membrane nécessaires au fonctionnement d'un transporteur tel que MexB par exemple (Figure 24). Il a été possible, comme décrit au chapitre précédemment, de réaliser un assemblage tripartite entre MexAB insérés dans un premier liposome et TolC inséré dans un second liposome, puis mesurer en direct l'activité d'efflux de la pompe au moyen de rapporteurs fluorescents (Verchère 2014).

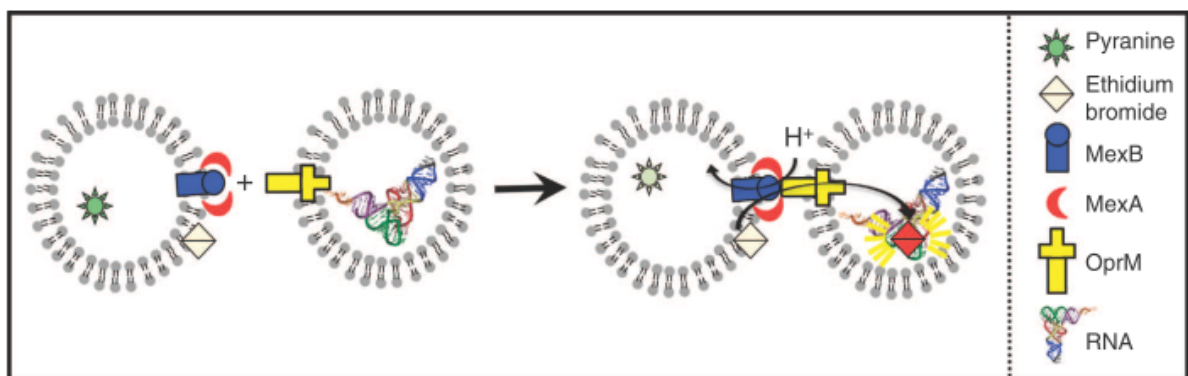


Figure 24 : Mesure de l'activité d'une protéine membranaire reconstituée en liposome. La mesure de l'activité de la pompe à efflux MexAB-OprM est observable par les variations de fluorescence qu'elle engendre dans les différents liposomes. Le liposome MexAB contient de la pyranine dont la fluorescence s'éteint à mesure qu'il s'acidifie et le liposome OprM contient un ARN qui lie la molécule substrat de MexB et voit sa fluorescence augmenter. Ce stratagème est rendu possible par l'utilisation de liposomes qui permettent la différenciation entre un milieu extérieur et un milieu intérieur dont les compositions respectives sont maîtrisables (Verchère 2015).



La ressemblance des liposomes vis-à-vis des membranes biologiques, la possibilité de contrôler leur composition lipidique, la bonne stabilité qu'ils confèrent aux protéines qui y sont reconstituées et leur manipulation facile en font un système mimétique de choix pour l'étude fonctionnelle des protéines membranaires. Cependant, l'étude structurale, par microscopie électronique par exemple, est exclue, les dimensions des liposomes ne permettent pas des observations de molécules uniques.

### C.3 Nanodisques

Décrits la première fois en 2002 par Sligar et Bayburt, les nanodisques sont des nanoparticules discoïdales constituées d'une bicouche lipidique dont les chaînes alkyles des lipides à la périphérie sont stabilisées par les acides aminés hydrophobes de protéines d'échafaudage. Ces dernières sont dérivées de l'apolipoprotéine A-I impliquée dans la formation des HDL chez l'Homme. Ces particules discoïdales d'abord, sphériques après maturation, sont associées à des phospholipides ainsi que du cholestérol afin d'assurer l'homéostasie de ce dernier dans l'organisme en réalisant le transport de celui-ci depuis les cellules vers le foie. L'ApoA1 a été légèrement modifiée par Sligar en retirant le N-terminal qui code pour une structure globulaire, puis renommée MSP pour « Membrane Scaffold Protein ». Les MSP sont donc des protéines recombinantes constituées de plusieurs hélices amphiphiles capables de spontanément s'assembler avec des lipides pour former un nanodisque après retrait du détergent. Différentes tailles de MSP permettent la reconstitution de disques lipidiques de diamètres différents compris entre 9 et 17 nm (Richtie 2009). Deux MSP stabilisent un nanodisque selon un arrangement en double ceinture, les hélices de chaque MSP sont orientées parallèlement au plan de la membrane (Nath 2007). Ceci vient de ce que la largeur du domaine hydrophobe de la bicouche nécessite la présence de deux hélices, l'une

au-dessus de l'autre, pour recouvrir complètement les chaînes alkyles. Si le mélange de reconstitution contient aussi une protéine membranaire d'intérêt, celle-ci sera insérée dans le nanodisque, occupant la place des lipides. Le contrôle du ratio protéine:lipides:MSP est donc crucial pour un processus de reconstitution correct (Bayburt 2006). Un ratio non optimisé entraîne la formation d'espèces indésirables, liposomes ou formes oligomériques non recherchées pour les protéines d'intérêt.

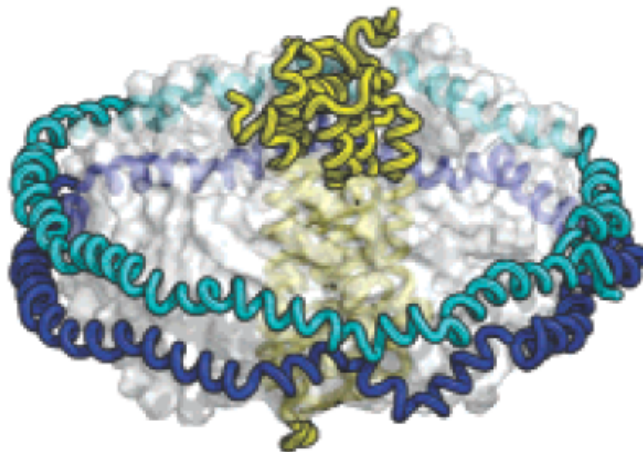


Figure 25 : Modèle de bactériorhodopsine insérée dans un nanodisque. Les nanodisques stabilisent une protéine membranaire insérée dans une bicouche lipidique, délimitée par deux protéines d'échafaudage, MSP. Ces protéines amphiphiles ceignent la bicouche en recouvrant les chaînes alkyles des lipides. La taille d'un nanodisque, nanométrique, est variable et dépend de la MSP utilisée (Nath 2007).

Les protéines membranaires reconstituées par cette méthode sont plus stables, dans le temps et en température, que lorsqu'elles sont stabilisées en détergent, du fait de la présence de lipides organisés tels qu'ils sont dans une membrane biologique. A l'instar des liposomes, la composition lipidique est contrôlable, et le nanodisque permet la mesure d'activité enzymatique des protéines ainsi reconstituées (Jiarong 2017). L'avantage certain des nanodisques est leur petite taille et leur monodispersité qui en font des objets d'étude adaptés à la microscopie électronique. Les aspects fonctionnels et structuraux des protéines

membranaires sont donc accessibles par l'étude de protéines reconstituées en nanodisques. Ces systèmes font aussi l'objet de recherches pour l'adressage de lipides et de protéines *in vivo* (Numata 2013).

Selon une logique similaire à celle employée par Sligar et ses collaborateurs, une technique de reconstitution en nanodisque a été développée récemment qui fait usage d'une protéine d'échafaudage alternative, la saposine A, appartenant à une famille protéique dont les membres ont des propriétés de transport et d'association avec les lipides (Frauenfeld 2016). La saposine A est un petit peptide d'environ 80 acides aminés qui s'organisent en hélices amphiphiles, et à l'instar des MSP, permettent d'enserrer les segments hydrophobes d'un disque lipidique entourant une protéine membranaire (Figure 26).

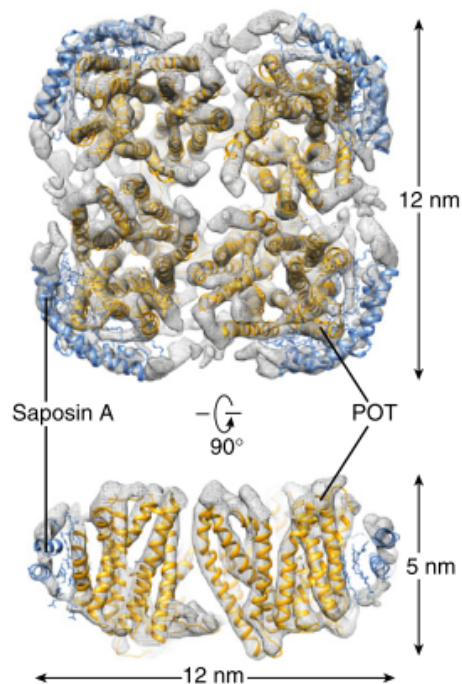


Figure 26 : Stabilisation d'une protéine membranaire par la Saposine A. Cette alternative aux nanodisques consiste à utiliser une autre protéine amphiphile que la MSP pour obtenir un résultat similaire.

## C.4 Polymères synthétiques

Récemment, de nouvelles alternatives ont été développées pour stabiliser en phase aqueuse les protéines membranaires. Celles-ci ne comptent plus sur l'utilisation de molécules similaires à celles présentes dans l'environnement physiologique de ces protéines, mais au contraire, ont recours à des polymères amphiphiles synthétiques au comportement proche de celui des détergent, mais avec l'avantage d'un supplément de stabilité.

### C.4.1 Amphipols

Les Amphipols sont des polymères synthétiques dont les chaînes alkyles se fixent avec une forte affinité aux parties transmembranaires des protéines qu'ils stabilisent de sorte que le complexe protéine-polymère soit résistant à la dilution, le polymère formant une ceinture de 2 nm d'épaisseur environ autour des segments hydrophobes de la protéine (Zoonens 2014). Ces molécules offrent une stabilisation plus efficace que les détergents par le maintien des interactions protéine-protéine ainsi que la préservation de la structure de ces dernières (Popot 2011). Il est possible de compléter les micelles d'Amphipols par des lipides qui viendront accroître la stabilité des protéines ainsi stabilisées (Dahmane 2013). La molécule la plus utilisée de cette famille de polymères est le A8-35 (Figure 27), constituée de 35 unités acrylate en moyenne et possédant une masse moyenne de 4,3kDa (Giusti 2014). A l'instar des détergents, ces molécules solubles dans l'eau sont capables de s'auto-assembler en micelles de 6,3 nm de diamètre et de masse moyenne de 40 kDa, lorsque la concentration dépasse un seuil nommé ici Concentration Critique d'Agrégation (CAC, Critical Aggregation Concentration) valant 2 mg/L pour A8-35. Cette faible CAC explique le comportement similaire aux détergents à faible CMC.

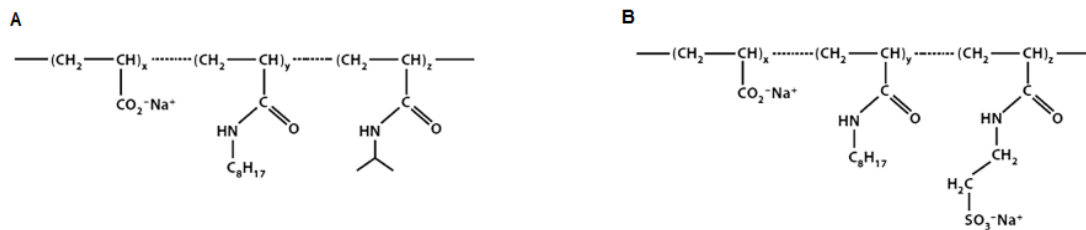


Figure 27 : Formule chimique de deux Amphipols. A- Amphipol A8-35, les groupements carboxylates assurent l'hydrophilicité de la molécule tandis que les longues chaînes alkyles permettent l'association aux protéines membranaires. B- Variation de l'A8-35 contenant des groupements sulfates qui garantissent la stabilité de l'Amphipol aux pH acides. (Zoonens 2014).

Les Amphipols sont remarquables par leur capacité à stabiliser des protéines aux segments transmembranaires de tailles très différentes, allant d'une simple hélice transmembranaire jusqu'au supercomplexe du respirasome (Popot 2003 ; Althoff 2011). Ces molécules sont cependant sensibles au pH, la composante hydrophile des Amphipols est généralement portée par des groupements carboxylates qui sont progressivement neutralisés lorsque le pH approche une valeur de 6, ce qui précipite le polymère. Bien que les Amphipols soient capables de perméabiliser des systèmes de membranes, ceci demeure un processus long et difficile, qui n'atteint pas l'étape de solubilisation et ne permet pas l'extraction de protéines membranaires, au contraire des détergents (Marie 2014). Il faut donc avoir préalablement extrait les protéines en détergent et échanger ce dernier avec les Amphipols par dialyse, chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou utilisation de BioBeads (Figure 28).

Par ailleurs, la présence de molécules amphiphiles compétitrices dans une solution de complexes protéines-Amphipols, tels que des détergents ou des liposomes, entraîne un échange rapide entre ces différentes phases, ce qui peut être utilisé pour délivrer des protéines stabilisées en amphipols vers des liposomes par exemple (Zoonens 2007). Les Amphipols

permettent de stabiliser des molécules isolées et monodisperses pour des études structurales par microscopie électronique (Althoff 2011), mais permettent aussi des études fonctionnelles puisqu'ils maintiennent l'activité enzymatique des protéines qu'ils stabilisent (Gorzelle 2002). Cependant, il est possible que les Amphipols inhibent les activités des protéines qui nécessitent de larges réarrangements conformationnels pour leur fonction comme ce semble être le cas pour l'ATPase SERCA (Picard 2006).

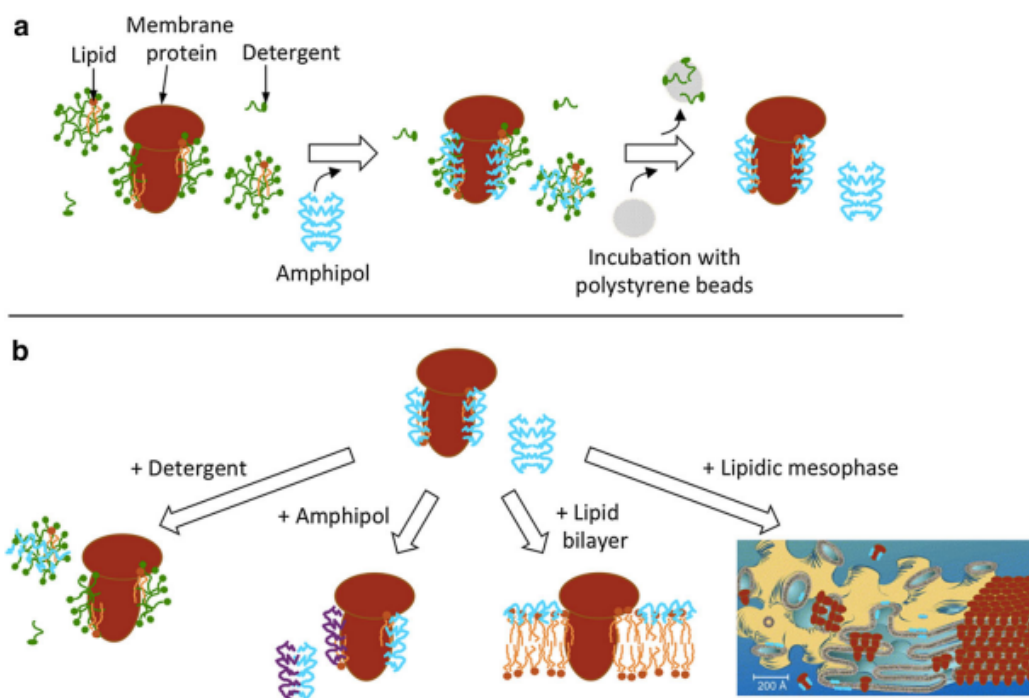


Figure 28 : La facilité d'échange des Amphipols en font un outil versatile. A- La reconstitution d'une protéine membranaire en Amphipol se fait par simple retrait de détergent. B- Les Amphipols sont capables de s'échanger avec d'autres molécules amphiphiles et permettent, une fois la protéine stabilisée en Amphipol, de la transférer vers d'autres systèmes mimétiques (Zoonens 2014).

#### C.4.2 Copolymère d'Acide Styrène Maléique (SMA)

Nouvellement apparus dans la littérature, les SMA permettent de stabiliser des protéines membranaires entourées d'une ceinture lipidique à l'instar des nanodisques (Knowles 2009). Cependant, au contraire des Amphipols, les propriétés particulières de ce copolymère lui confèrent la capacité d'extraire directement les protéines des membranes dans lesquelles elles se trouvent (Figure 29). Il a été possible de purifier par cette méthode le transporteur RND AcrB, puis de procéder à son étude structurale par cryo-ME (Postis 2014). Cette dernière a révélé la présence de lipides résiduels des membranes natives des bactéries desquelles ont été extraites les protéines. Ce résultat est significatif puisqu'il indique que les SMA forment des particules de protéines mais aussi de lipides endogènes qui se trouvaient à proximité de celles-ci. Ceci évite les biais possiblement engendrés par l'utilisation de lipides synthétiques qui ne correspondent pas toujours à ceux qui occupent les membranes dans un contexte physiologique. Des études plus précises ont montré que la composition lipidique des particules obtenues par extraction avec la méthode SMA est représentative de la membrane dans laquelle se trouvait la protéine purifiée, mais aussi, qu'elle conserve l'enrichissement local en lipides spécifiques nécessaires à la stabilité et au bon fonctionnement de la protéine membranaire (Long 2013 ; Dorr 2014).

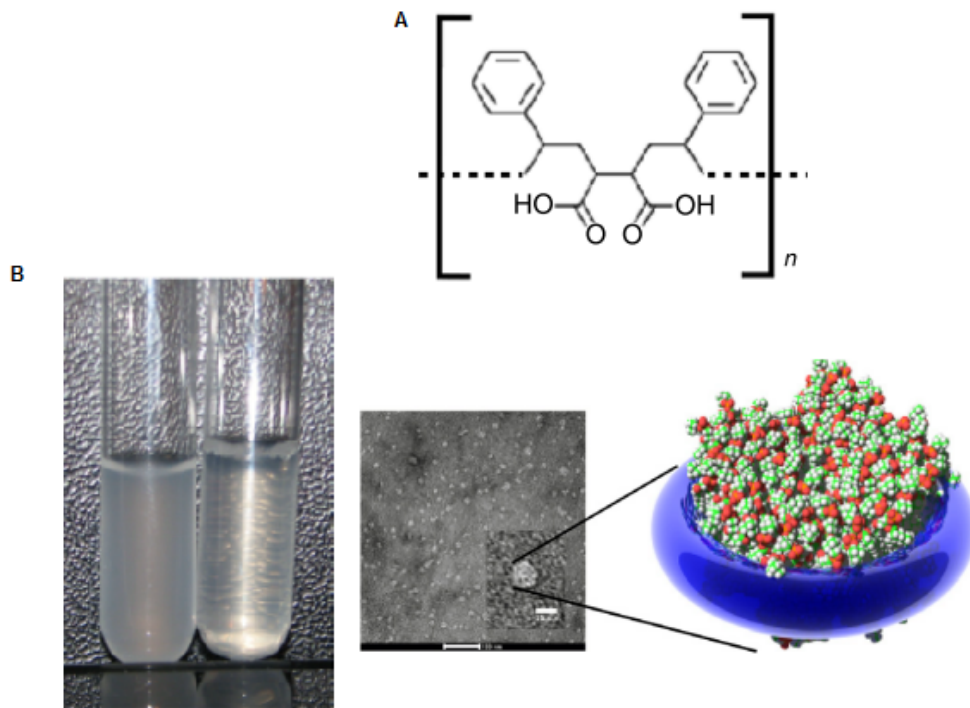


Figure 29 : Solubilisation de lipides par SMA. A- Structure chimique du polymère SMA. B- L'incubation de SMA avec des vésicules lipidiques pendant 2 h permet la formation de nanodisques lipidiques comme l'indique le passage d'une solution trouble à limpide et les observations au ME de disques nanométriques. En présence de membranes, les SMA extraient à la fois les protéines membranaires et les lipides à leur contact (Postis 2014).







## **Chapitre 2 :**

### **Reconstitution du transporteur RND et de la protéine canal OMF en nanodisque et assemblage tripartite.**

Au cours de ma thèse j'ai étudié l'effet de différents paramètres sur la formation du complexe tripartite et en particulier l'apport des méthodes de stabilisation décrites précédemment sur des protéines membranaires du système d'efflux MexA-MexB-OprM.

J'ai donc commencé un travail d'optimisation de la reconstitution en nanodisques des protéines MexB et OprM durant mon stage de Master 2, travail qui s'est poursuivi pendant ma thèse et a permis l'observation du complexe tripartite MexAB-OprM reconstitué *in vitro*. Ces travaux ont fait l'objet d'un chapitre publié en 2017 dans Membrane protein Structure and function characterization : methods and protocols, Methods in molecular biology (présenté en Annexe). Le chapitre qui vient décrit la reconstitution en nanodisque des protéines OprM et MexB ainsi que leur utilisation pour la formation du complexe tripartite MexAB-OprM. Les protéines impliquées dans le complexe tripartite ont été fournies par nos collaborateurs Gilles Phan et Isabelle Broutin de l'Université Paris Descartes. J'ai moi-même réalisé une purification de la protéine MexB dans le laboratoire d'I. Broutin au cours de ma thèse.

L'assemblage de la pompe à efflux à partir des trois protéines natives en détergent ne se faisant pas spontanément, l'outil nanodisque s'est imposé pour l'ensemble des qualités qu'il

offre, concernant à la fois la facilité d'observation par ME ainsi que le supplément de stabilité notamment dans le temps qu'un environnement lipidique confère à MexB et OprM. De plus, les nanodisques semblaient pouvoir s'accommoder plus simplement de l'ajout de MexA palmitoylé en détergent, du fait de la disponibilité d'une phase lipidique pour l'ancrage de ce dernier. Ce mode de production du complexe tripartite, qualifié de tout-en-un ou méthode 1, se différencie d'un deuxième mode de production de la pompe à efflux en deux étapes, qualifié de méthode 2, consistant en un mélange de nanodisques MexAB et OprM. Ces deux alternatives sont décrites dans les pages qui suivent.

## A) Production des protéines échafaudage membranaire MSP1D1 et MSP1E3D1.

Les MSP sont exprimées et produites dans la fraction soluble de bactéries *E.coli* puis purifiées par leur étiquette histidine localisée en N-terminal, selon un protocole déjà établi (Richtie, 2009). Malgré la grande hydrophobicité de ces protéines, le caractère amphiphile des hélices qui les composent leur permet de les arranger de telle manière à ce que seules les parties hydrophiles soient exposées au solvant. Un tel repliement n'est cependant pas propice à la formation de nanodisque et justifiera l'utilisation d'un détergent dans le mélange de reconstitution dont le rôle consiste à exposer les segments hydrophobes des MSP pour permettre leur interaction avec les lipides. Ce détergent est le cholate de sodium, analogue structural du cholestérol qui est la molécule naturellement en interaction avec les Apolipoprotéines A1 dont dérivent les MSP. Même s'il demeure possible de reconstituer des nanodisques à partir d'une production conservée extensivement à -80°C, il est préférable de recommencer régulièrement le processus de production et purification afin d'obtenir des lots de MSP assurant une efficacité de reconstitution maximale, stratégie adoptée pour les

expériences figurées dans ce manuscrit. Les gels SDS-PAGE de la figure 30 montrent des résultats représentatifs de purification sur colonne Ni-NTA pour les protéines MSP1D1 de 24,5 kDa et MSP1E3D1 de 32,6 kDa.

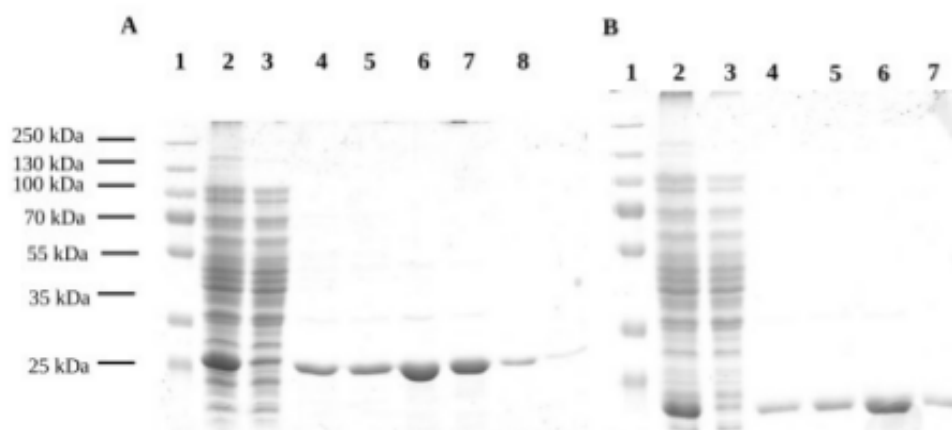


Figure 30 : Résultats de purification des MSPs. Gels SDS-PAGE 12% colorés au bleu de Coomassie. Les fractions 5 à 8 sont rassemblées et concentrées pour utilisation. A-MSP1E3D1 1-Pageruler plus prestained protein ladder 10-250k (Lifesciences) 2-Lysat bactérien, 3-Non fixé, 4 à 8-Fractions éluées à 0,4 M imidazole, B-MSP1D1 même légende.

MSP1D1 et MSP1E3D1 diffèrent par leur nombre d'hélices, dix pour la première et 13 pour la seconde, résultant d'une duplication entre H6 et H7 des hélices H4, H5 et H6 (Figure 31). Les différentes longueurs de MSP entraînent la formation de nanodisques dont le diamètre de la population majoritaire est approximativement 10 nm pour MSP1D1 et 12 nm pour MSP1E3D1. Le choix de ces deux variants est particulièrement adapté aux protéines qu'il m'a fallu reconstituer en nanodisque. En effet, la région transmembranaire du trimère de MexB mesure environ 9 nm tandis que le tonneau de feuillet  $\beta$  de OprM a un diamètre de 5 nm. Le recours à la MSP1E3D1 pour reconstituer les nanodisques MexB (MexB-ND) et MSP1D1 pour reconstituer les nanodisques OprM (OprM-ND) est cohérent avec les dimensions respectives des protéines et des nanodisques attendus, tout en permettant la

formation d'un disque lipidique autour de ces dernières.

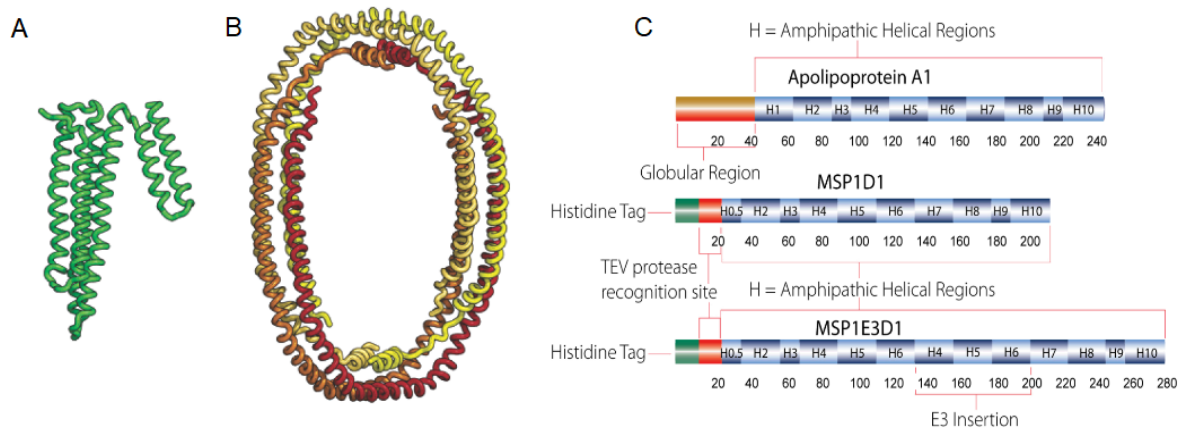


Figure 31 : Propriétés structurales des MSP. A et B- Structures cristallographiques de l’Apolipoprotéine A1 et de la MSP1D1 respectivement (Sligar 2007). La délétion de 43 acides aminés en N-terminal permet à la protéine d’adopter un arrangement discoïdal similaire à celui attendu pour le nanodisque final. C- Représentation schématique des séquences d’acides aminés des protéines ApoA1 et MSP1D1 et MSP1E3D1 (Sigma).

## B) Reconstitution de Mexb et OprM en nanodisques

Le mélange de reconstitution se compose des protéines d’intérêt pures, des MSP, de lipides, d’un Tampon adéquat et des détergents spécifiques de chacune des protéines. Le retrait rapide des molécules de détergent par piégeage au sein de billes de polystyrène conduit à la formation spontanée de nanodisques (Figure 32).

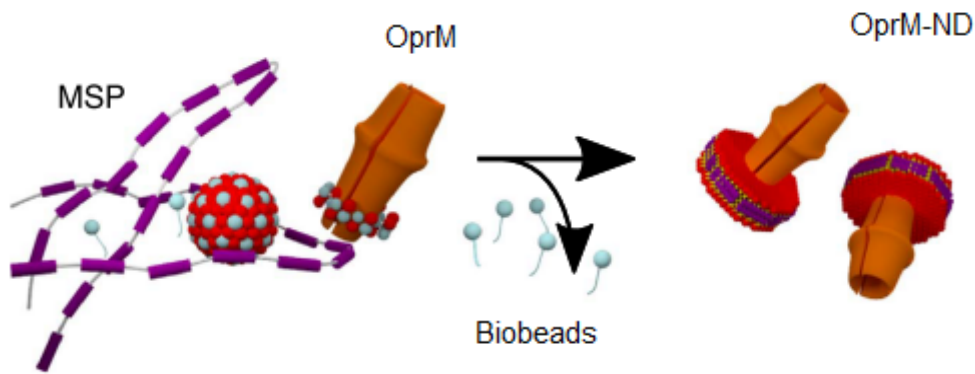


Figure 32 : Schéma du processus de reconstitution de OprM en nanodisque. La MSP1D1, les lipides POPC et la protéine OprM pure en détergent sont mélangés 1h à 4°C puis l'ajout de Biobeads sur la nuit permet le retrait de détergent qui déclenche la reconstitution en nanodisques.

Le contrôle du ratio molaire protéine:lipides:MSP est le paramètre critique pour assurer un bon rendement de reconstitution, qui est caractérisé par la présence d'une espèce largement majoritaire de trimère MexB ou OprM au sein d'un nanodisque. Par exemple, si la concentration en lipides est trop importante, la solution sera contaminée par la présence de liposomes ou de vésicules lipidiques ; un ratio mal maîtrisé peut aussi favoriser la stabilisation de plusieurs trimères de MexB ou d'OprM au sein d'un même nanodisque.

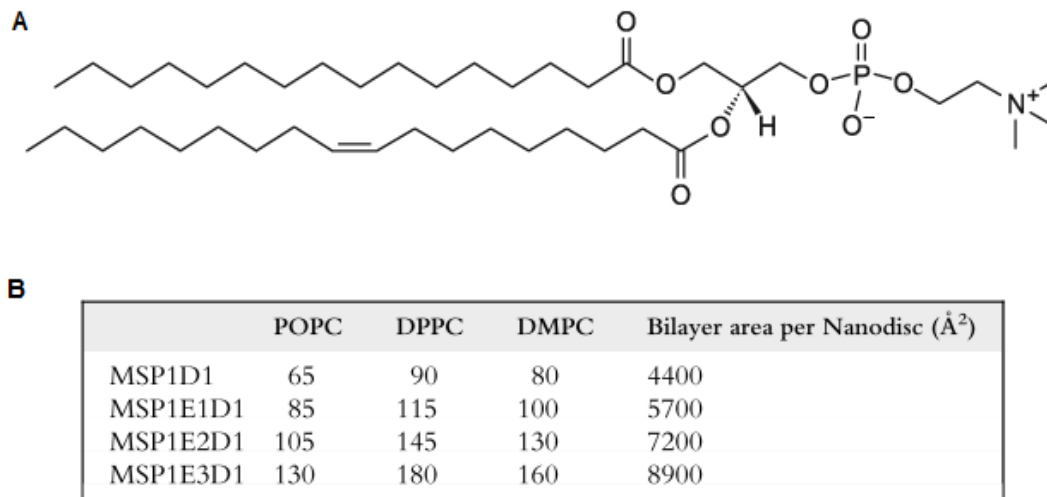


Figure 33 : Détermination du ratio protéine:MSP:lipides. A- Formule chimique des lipides utilisés pour la reconstitution de nanodisques au cours de cette thèse. B- Ce tableau détaille à partir d'expériences références, les propriétés des nanodisques reconstitués avec différents lipides et différentes MSP. Connaissant l'aire de ceux-ci et l'aire de la protéine à insérer, il est possible d'estimer un premier ratio protéine:lipides:MSP qui sert de point de départ pour l'optimisation (Ritchie 2009).

Le point de départ de l'optimisation de ce ratio consiste en l'estimation de la surface occupée par la protéine d'intérêt dans un nanodisque ne contenant que les lipides choisis, ici POPC (Figure 33). En effet, les quantités de lipides ainsi que les dimensions des nanodisques formés par ces derniers en présence de différentes MSP sont connues (Ritchie, 2009). En évaluant la surface restante accessible aux lipides, il est possible de déterminer le ratio molaire protéine:lipides:MSP de référence. La réalisation expérimentale de reconstitutions avec des ratios encadrants celui de référence permet d'affiner ce dernier. La qualité de la reconstitution est évaluée à la fois par des observations de ME en coloration négative mais aussi par le profil du chromatogramme obtenu en sortie de SEC. Ce dernier permet de repérer aisément les différentes populations présentes dans l'échantillon en fin de reconstitution (agrégats, nanodisques d'intérêts, nanodisques multiples) et de suivre l'évolution de leurs



proportions respectives en fonction du ratio utilisé.

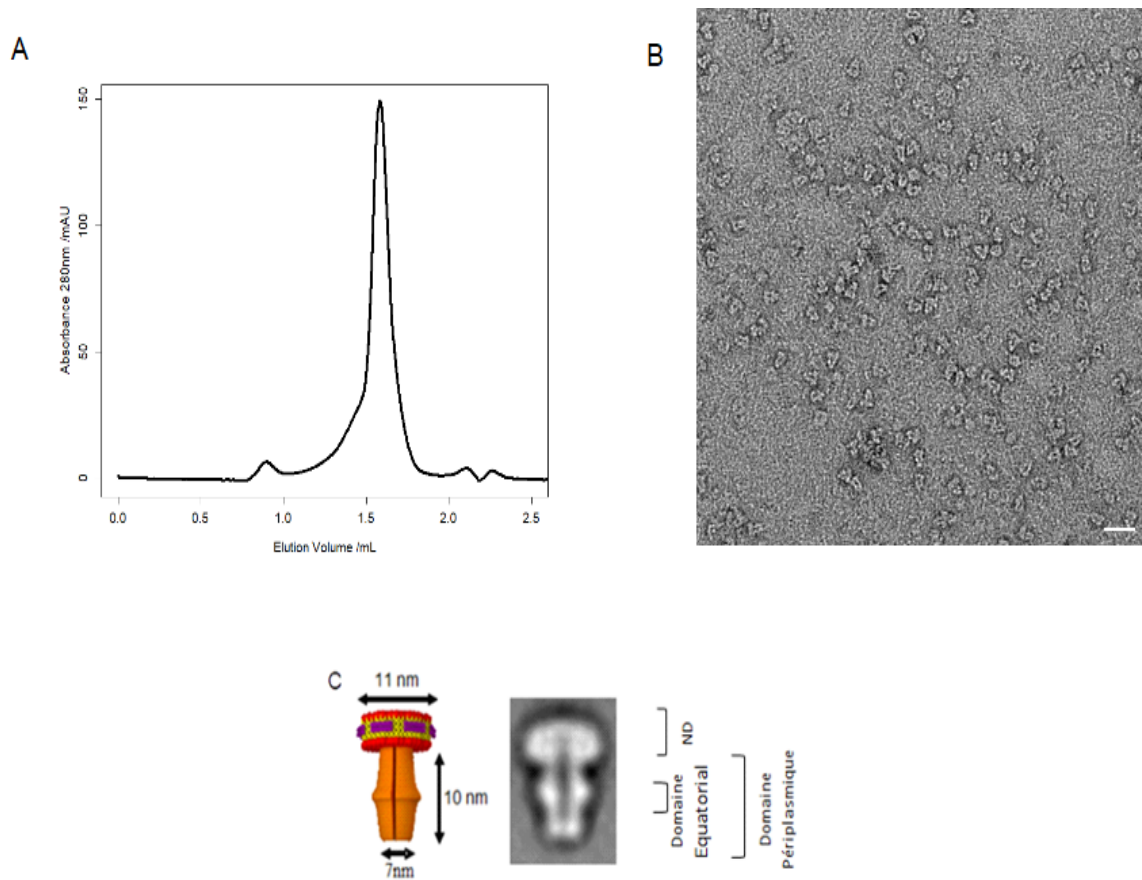


Figure 34 : Reconstitution en nanodisque de la protéine OprM. A- Le profil de purification par chromatographie d'exclusion stérique présente un pic majoritaire à un volume élué de 1,25 mL qui contient les nanodisques d'intérêt. Un épaulement pour un volume élué plus faible est observé qui indique la présence de nanodisques doubles. B- Champs de ME en coloration négative du pic majoritaire révèle une solution homogène de OprM-ND. C- Image moyenne 2D de OprM-ND en coloration négative réalisée à partir de 500 images. Un schéma présente les dimensions de ses principales caractéristiques structurales. Barre d'échelle, 30 nm.

En procédant de cette manière, il fut possible de déterminer les ratios protéine:lipides:MSP conduisant aux meilleurs rendements pour la formation de MexB-ND : 1:204:6 ; ainsi que pour la formation de OprM-ND : 1:82:3,5. Les ratios sont calculés en rapport des espèces trimériques de MexB et OprM puisque ce sont celles qui nous intéressent

et qu'elles correspondent aux formes purifiées en détergent de ces protéines. Pour ces ratios optimisés, la SEC présente un pic majoritaire dont les observations par ME en coloration négative confirment qu'il se compose d'une population uniforme et homogène en nanodisque MexB ou OprM. Les champs d'observation bruts et mieux encore les images moyennes obtenues pour chaque espèce de nanodisque apportent une confirmation visuelle des principaux éléments structuraux de chaque protéine, tels qu'ils avaient été déterminés par diffraction au rayons X. Ainsi pour MexB (Figure 34), les domaines (pore-domain et funnel-domain) sont clairement identifiables et exhibent les dimensions attendues (7 nm) ; tandis que pour OprM (Figure 35), le canal périplasmique de 10 nm est aisément repérable ainsi que le domaine équatorial constitué par de courtes hélices parallèles au plan de la membrane. Il est possible d'observer que l'extrémité périplasmique d'OprM est en conformation fermée, qui est donc sa conformation de repos. Dans les deux cas un domaine transmembranaire épais, environ 5 nm, est recouvert par l'ensemble MSP-lipides, c'est-à-dire le nanodisque à proprement parlé, dont les dimensions correspondent à celles qui étaient attendues, soit 12 nm de large en moyenne pour MexB et 10 nm pour OprM.

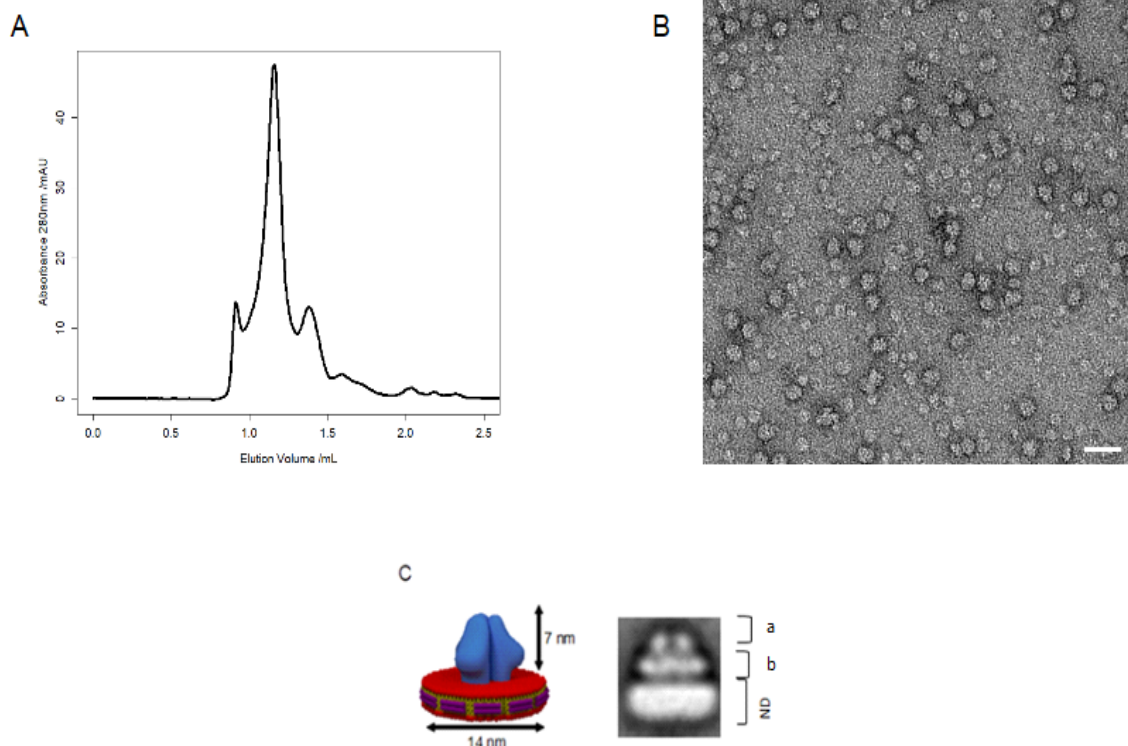


Figure 35 : Reconstitution en nanodisque de la protéine MexB. A- Le profil de purification par chromatographie d'exclusion stérique présente un pic majoritaire pour un volume élué de 1,1 mL qui contient les nanodisques d'intérêt. Un épaulement pour un volume élué plus faible est observé qui indique la présence d'agrégats. B- Champs de ME en coloration négative du pic majoritaire révèle une solution homogène de MexB-ND. C- Image moyenne 2D de MexB-ND en coloration négative réalisée à partir de 300 images. Un schéma présente les dimensions de ses principales caractéristiques structurales, a, domaine d'ancrage à l'OMF, b, domaine de transfert. Barre d'échelle, 30 nm.

### C) Reconstitution de nanodisques MexAB.

Pour des raisons évoquées plus en détails dans le chapitre 5, tenant à la présence de détergent dans le mélange final mais aussi car il est physiologiquement réaliste d'envisager que le complexe « membre interne » MexAB s'assemble en amont de toute interaction avec l'OMF OprM, des tentatives de co-reconstitution en nanodisque de ces deux protéines ont été poursuivies.

Le processus de reconstitution est similaire à celui décrit précédemment pour un simple nanodisque MexB, à la différence qu'une protéine supplémentaire est présente dans le mélange, à savoir MexA. Ce dernier est ajouté en excès par rapport à son partenaire MexB, soit un ratio molaire 1:10 MexB:MexA. En effet, la propension de PAP à interagir avec elles-mêmes conduit à la formation d'oligomères non productifs lors du retrait de détergent, favorisant des interactions par les domaines Membrane Proximal de plusieurs MexA. Ces objets sont généralement repérables par analyse en ME du mélange après reconstitution du fait de leur topologie particulière qui évoque une rosace (Figure 36). De plus, MexA a la possibilité de venir s'insérer dans le feuillet membranaire opposé à celui contenant la partie périplasmique du MexB, séquestrant ces protéines qui n'interagiront plus avec le transporteur RND. Ce ratio de 1 pour 10 est donc nécessaire non seulement pour des raisons stœchiométriques fondamentales, car il faut entre 3 et 6 unités de MexA pour un trimère de MexB, mais aussi car le processus de reconstitution lui-même conduit à une perte d'unités de MexA dans des espèces improductives. Les images de ME obtenues après reconstitution permettent d'identifier un mélange d'objets, nanodisques MexB, MexAB et agrégats. Les propriétés respectives des protéines (auto-association) et la nature même du processus de reconstitution (combinatoire aléatoire des espèces en solution) n'ont pas permis l'optimisation du ratio quaternaire MexA:MexB:MSP:lipides de sorte que seuls soient reconstitués des objets MexAB.

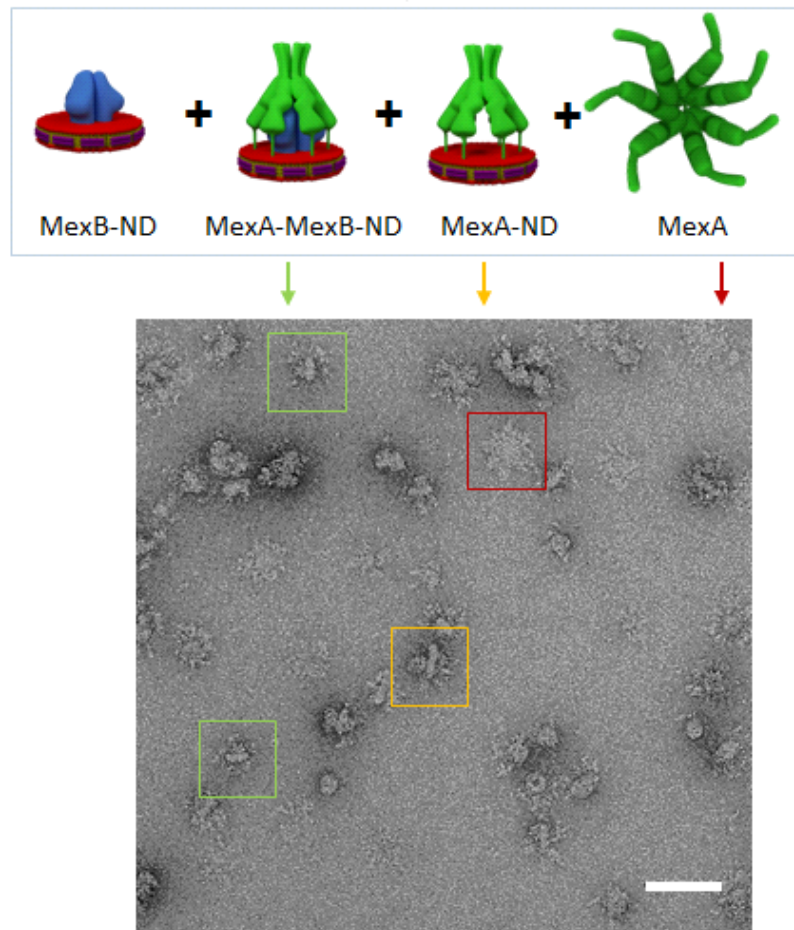


Figure 36 : Différentes espèces sont produites pendant le processus de co-reconstitution de MexAB-ND. Les schémas des différentes organisations structurales possibles sont présentés avec les objets observés en ME en coloration négative qui leur correspondent. Barre d'échelle, 30 nm.

## D) Assemblage du complexe tripartite MexAB-OprM tout-en-un (méthode 1).

Pour ce mode d'assemblage, les nanodisques MexB et OprM, préalablement gel purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sont mélangés avec la protéine MexA purifiée en détergent (Figure 37). L'introduction de détergent dans ce mélange est nécessaire afin de garantir la stabilité colloïdale de la protéine MexA qui formerait des agrégats dans le cas contraire. En effet, le recours aux protéines natives stabilisées dans un environnement « physiologique » pour MexB et OprM, présente des inconvénients dans le cas de MexA qui possède une ancre lipidique qui limite sa solubilité en phase aqueuse. Expérimentalement, les meilleurs résultats sont obtenus pour une concentration finale en détergent proche de sa CMC. Le mélange est incubé à température ambiante pendant une semaine. Ce long temps d'incubation est nécessaire à la formation d'une quantité de pompes suffisante pour une observation par ME. L'assemblage tripartite se forme donc spontanément et ne nécessite aucun apport d'énergie supplémentaire ce qui confirme les données de la littérature.

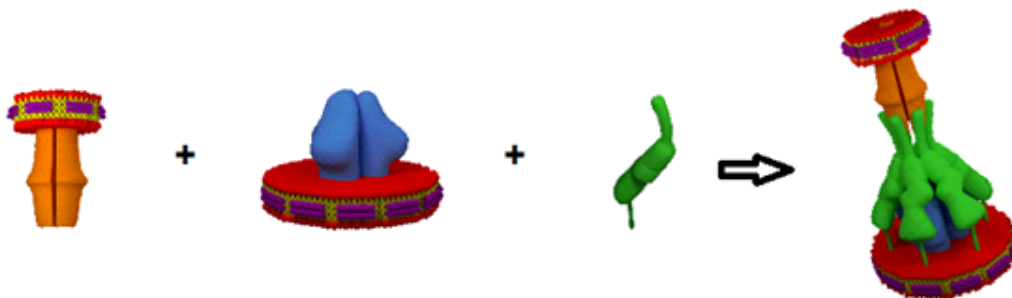


Figure 37 : Représentation schématique du mode d'assemblage tripartite tout-en-un. Les nanodisques OprM et MexB sont mis en présence de la protéine pure en détergent MexA dans un ratio 1:1:10. De nombreux complexes sont formés après incubation durant 1 semaine.

Les grilles de ME en coloration négative montrent la présence de MexB-ND et OprM-ND seuls, n'ayant pas encore réagi pour former le complexe tripartite. Cependant de nouveaux objets sont apparus, remarquables par leur forme et leur dimension, ces bâtonnets d'une longueur totale de 30 nm sont les complexes MexAB-OprM (Figure 38). Il est possible de distinguer OprM-ND qui contacte, par son extrémité en conformation ouverte, une structure plus longue que MexB seul mais dont la base permet de l'identifier. Une analyse plus poussée qui recourt à une image moyenne révèle que 5 nm séparent les extrémités de MexB et OprM. Cette zone est comblée par MexA (Daury 2016).

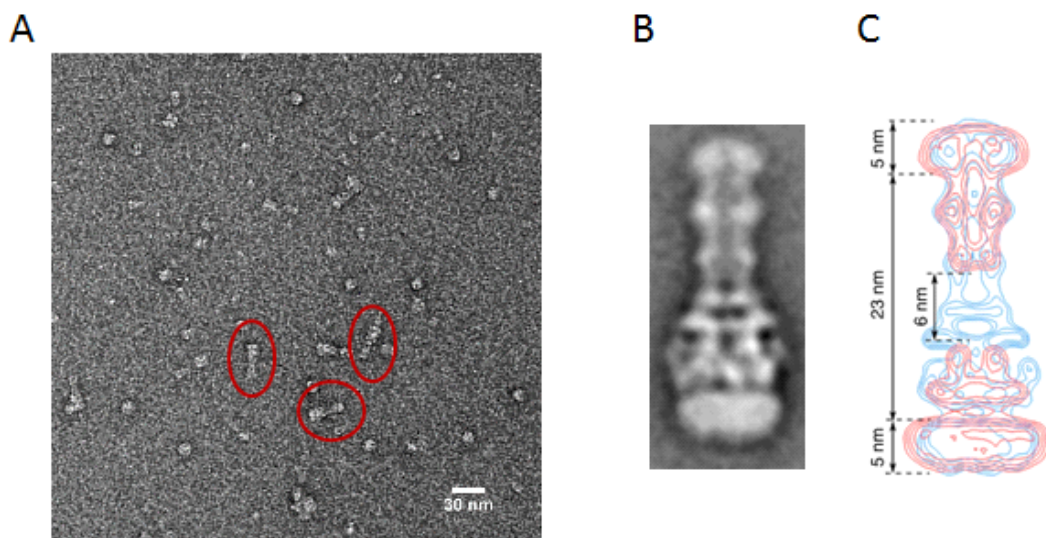


Figure 38 : Structure du complexe tripartite MexAB-OprM. A- Champs d'observation en ME coloration négative du mélange MexB-ND, OprM-ND et MexA après une semaine d'incubation. Les complexes sont des objets allongés de 33 nm de long entourés en rouge. B- Image moyenne de la pompe à efflux à partir de 157 images permet de distinguer les différents composants, OprM dont le canal est ouvert, le complexe MexAB et les nanodisques. C- Carte isocontour de MexB-ND et OprM-ND en rouge, les densités restantes, en bleu, sont représentatives de la protéine MexA qui vient fermer le canal entre OprM et MexB.

La purification de ce complexe tripartite par chromatographie d'exclusion stérique est compliquée dans la mesure où il faut maintenir une concentration adéquate en détergent pour éviter que MexA ne s'agrège et entraîne une élévation de pression dans la colonne ou bien qu'il ne vienne perturber les pompes à efflux déjà formées en s'y agréant. La purification en présence de détergent permet d'observer les complexes par ME cependant leur stabilité n'est pas bien maîtrisée et la formation d'agrégats apparaît au cours du temps. Par ailleurs, les concentrations importantes en détergents dans les solutions finales auraient rendu délicates les approches d'analyse de particules uniques par cryo-ME. Il a donc fallu mettre au point une méthode de formation du complexe qui s'affranchisse de la présence de détergent.

#### E) Assemblage du complexe tripartite MexAB-OprM séquentiel (méthode 2).

Dans ce mode d'assemblage, les nanodisques MexAB d'une part, et OprM d'autre part, sont mélangés sans ajout de détergent (Figure 39). Cette méthode a le bénéfice de mimer au mieux les conditions physiologiques, le complexe bipartite MexAB préformé dans la membrane interne allant chercher une interaction avec l'OMF le tout dans une solution dénuée d'agents chaotropiques qui pourraient influencer les structures des protéines ou leur association. De manière analogue à la méthode 1, les nanodisques sont incubés à température ambiante pendant une semaine puis le mélange est observé par ME en coloration négative. Les images obtenues sont similaires à celles produites par la méthode 1 et la structure du complexe tripartite semble identique. Ceci indique que la co-reconstitution MexAB a effectivement abouti à la formation de complexes bipartites fonctionnels MexAB. De plus, pour des temps d'incubation égaux, les quantités de pompes à efflux produites paraissent proches, indiquant que l'interaction préalable de MexA avec MexB n'influe pas la cinétique



d'interaction vis-à-vis d'OprM.

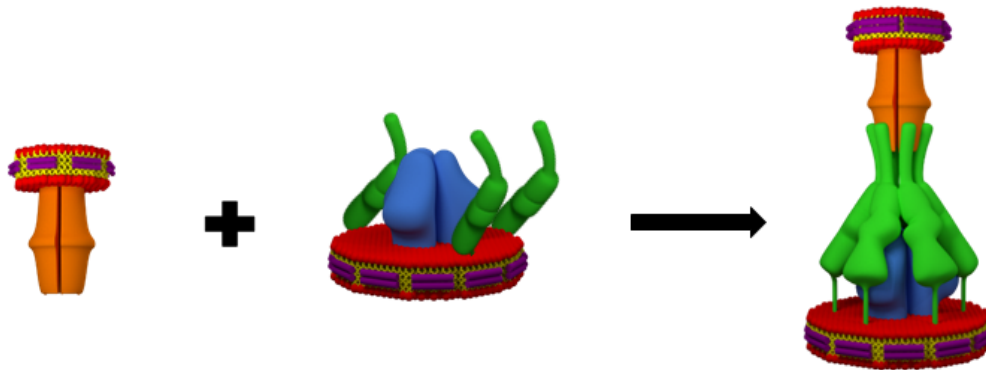


Figure 39 : Représentation schématique du mode d'assemblage tripartite séquentiel. Les nanodisques OprM et MexAB sont incubés pendant une semaine ce qui permet la formation de nombreux assemblages tripartites.

Cette méthode permettant l'assemblage spontané du complexe tripartite en absence complète de détergent rend possible des analyses structurales plus poussées par Cryo-ME décrites au chapitre 5. Cependant, afin d'obtenir un échantillon enrichi autant que possible en pompes à efflux pour ces études, une étape de séparation des objets selon leur rayon hydrodynamique par chromatographie d'exclusion stérique est appliquée. Celle-ci ne permet pas de séparer complètement les complexes tripartites des nanodisques MexAB et des agrégats élués dans le volume mort de la colonne, mais comme le montrent les images de ME en coloration négative, et le profil du gel SDS-PAGE, il existe une fraction particulièrement enrichie en complexes MexAB-OprM appropriée pour les études par cryo-ME (Figure 40).

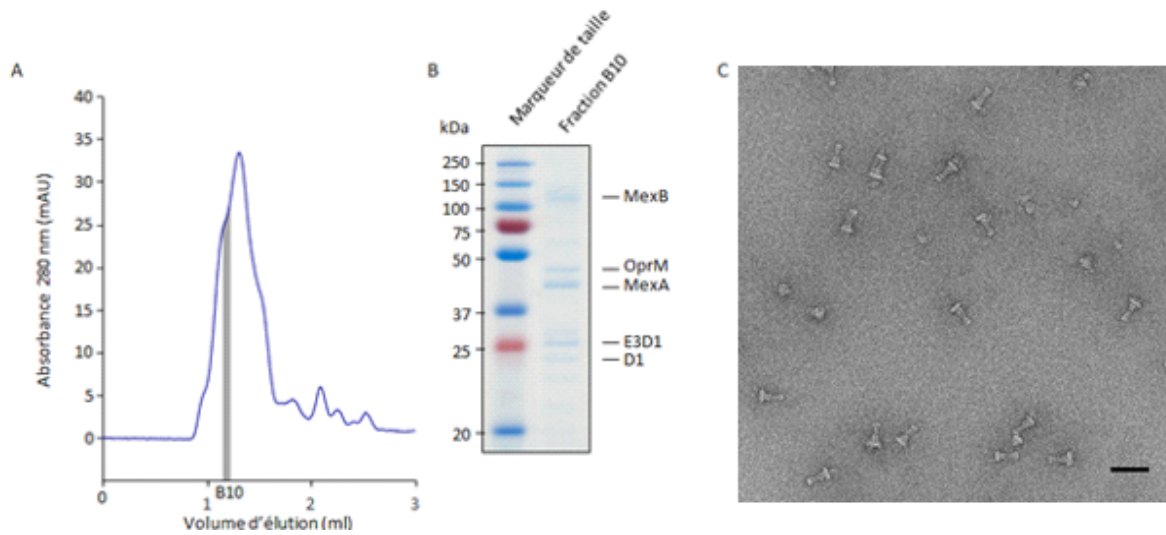


Figure 40 : Purification des complexes tripartites obtenus selon la méthode séquentielle. A- La chromatographie d'exclusion stérique ne permet pas de séparer complètement un pic homogène ne contenant que les pompes à efflux, cependant il existe une fraction, B10, particulièrement enrichie en complexes. B- La Fraction B10 déposée sur gel SDS-PAGE 12 % révélé au bleu de Coomassie, montre que chacune des protéines est présente dans la fraction B10. C- Champs d'observation par ME en coloration négative, la très grande majorité des objets observés sont des complexes tripartites ce qui confirme l'efficacité de la purification par la SEC. Barre d'échelle, 30 nm.





## **Chapitre 3 :**

### **Reconstitution des protéines membranaires MexB et OprM dans un nanodisque minimal dépourvu de lipides exogènes.**

Les différentes expériences de stabilisation des protéines membranaires par le système nanodisque et la nécessité d'étudier l'importance de la présence d'une phase lipidique pour l'ancrage de MexA à proximité de MexB pour la formation du complexe tripartite m'ont conduit à remettre en question le besoin de lipides au sein du système nanodisque. Le chapitre suivant résume les résultats obtenus et présentés dans un article accepté pour publication avec modifications mineures.

La protéine membranaire MexB est incubée dans son détergent en présence de MSP1E3D1 et de cholate de sodium pendant 1 heure avant ajout de biobeads pour retirer le détergent. En fin de reconstitution la solution est purifiée par SEC, ce qui permet d'éliminer les restes de détergents et le chromatogramme confirme que des particules MexB-MSP ont été reconstituées. Un deuxième pic apparaît en fin d'élution et provient de la MSP libre en solution. Il n'y a pas de différence majeure du comportement hydrodynamique des particules MexB-MSP et MexB-ND. Ceci vient de ce que la colonne utilisée n'a pas la résolution nécessaire pour distinguer ces deux objets dont la contribution principale au rayon hydrodynamique provient de la protéine MexB elle-même et non de la couronne lipidique. Les images de ME en coloration négative montrent une solution homogène de particules de MexB-MSP dont les caractéristiques générales sont identiques à celles de MexB-ND.

La caractérisation biochimique de MexB-MSP s'est poursuivie en analysant sur gel dénaturant SDS-PAGE les intensités de fluorescence respectives des bandes de MexB et de sa MSP. Ces expériences ont permis de montrer qu'un trimère de MexB est stabilisé par deux MSP1E3D1 comme c'est le cas pour les nanodisques lipidiques. Ce résultat suggère qu'il n'y a pas d'organisation significativement différente de la MSP autour de la protéine MexB en absence de lipides. Par ailleurs une étude de cryo-ME réalisée par Marie Glavier sur ces particules MexB-MSP révèle que la structure générale du transporteur RND n'est pas significativement modifiée par l'interaction avec la MSP. Il est en effet possible de faire correspondre la carte de densité électronique obtenue à 8 Å avec la structure cristallographique asymétrique de la protéine.

Enfin, des expériences de spectroscopie infrarouge ATR-FTIR ont été menées sur des particules MexB-MSP et MexB-ND pour quantifier la présence de lipides dans chacune de ces reconstitutions. L'augmentation de la quantité de lipides utilisée pour la reconstitution résulte en l'apparition d'un signal croissant caractéristique des lipides qui démontre dans le cas de MexB-MSP que la concentration de lipides endogènes éventuellement associés à la protéine est si faible qu'elle ne peut être détectée. Ce résultat plaide en la faveur d'interactions directes protéines-protéines entre MexB et MSP1E3D1.

En conclusion, il est possible de stabiliser une protéine membranaire avec uniquement la protéine MSP. Cette observation ouvre des perspectives intéressantes sur un plan structural et aussi fonctionnel, afin d'évaluer l'importance des lipides en utilisant un même système mimétique pour stabiliser la protéine.

Le détail des résultats est décrit dans l'article présenté ci-après, soumis et accepté pour publication avec modifications mineures dans le journal BBA.

## Minimal nanodisc without exogenous lipids for stabilizing membrane proteins in detergent-free buffer

Dimitri Salvador<sup>1,2§</sup>, Marie Glavier<sup>1,2,§</sup>, Guy Schoehn<sup>3</sup>, Gilles Phan<sup>4</sup>, Jean-Christophe Taveau<sup>1,2</sup>, Marion Decossas<sup>1,2</sup>, Sophie Lecomte<sup>1,2</sup>, Cyril Garnier<sup>4</sup>, Isabelle Broutin<sup>4</sup>, Laetitia Daury<sup>1,2§</sup>, Olivier Lambert<sup>1,2§</sup>

<sup>§</sup>Equally contributing first authors,

<sup>§</sup>Equally contributing last authors

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, CBMN UMR 5248, Bordeaux INP, F-33600 Pessac, France.

<sup>2</sup>CNRS, CBMN UMR5248, F-33600 Pessac, France,

<sup>3</sup> Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institute for Structural Biology (IBS), 38000, Grenoble, France.

<sup>4</sup> Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR 8015, CNRS, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006, Paris, France.

To whom correspondence should be addressed: Olivier Lambert, CBMN, UMR CNRS 5248, Université Bordeaux, Institut National Polytechnique Bordeaux, Allée Geoffroy Saint-Hilaire 33600 Pessac, France.

Tel: +33-540006829 and +33-540002200; Email: [o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr)

**Keywords:** Membrane protein, nanodisc, lipids, CryoEM

### **Abstract**

Membrane protein stabilization after detergent solubilization presents drawbacks for structural and biophysical studies, in particular that of a reduced stability in detergent micelles. Therefore, alternative methods are required for efficient stabilization. Lipid nanodisc made with the membrane scaffold protein MSP is a valuable system but requires a fine optimization of the lipid to protein ratio. We present here the use of the scaffold protein MSP without added lipids as a minimal system to stabilize membrane proteins. We show that this method is applicable to  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strands transmembrane proteins. This method allowed cryo-electron microscopy structural study of the bacterial transporter MexB. A protein quantification indicates that MexB is stabilized by two MSP proteins. This simplified and efficient method proposes a new advance in harnessing the MSP potential to stabilize membrane proteins.



## 1. Introduction

Membrane proteins play key roles in cellular activities and are major targets for medicinal drugs. One hurdle that limits their studies is related to their structural organization. They expose a hydrophobic surface that demands its incorporation into biological membranes. A major challenge for biochemical, biophysical and structural studies, is maintaining membrane proteins in a lipid-like environment for keeping them stable and monodisperse in solution. In order to maintain membrane protein integrity, various solutions for mimicking native lipid-bilayer environments have been described.

Scaffolding systems form a belt around the hydrophobic part of the membrane protein and unlike liposomes, these systems can stabilize membrane proteins as nanometer-size single particles. Scaffolding systems are based on polymers, peptides and proteins. Amphiphilic polymers (Amphipol and SMA) have been developed to stabilize the proteins after detergent exchange and to extract the proteins directly from their native lipid membrane [1,2]. Engineered amphipathic helices and  $\beta$ -sheet peptides are relatively efficient to form lipid nanodisc or to stabilize membrane proteins but present solubility and stability issues [3–5]. Lipoprotein such as apolipoprotein or saposin are potential scaffold proteins to form lipid nanoparticles after detergent removal [6,7]. Proteins in lipid nanoparticles, based on apolipoproteins ApoA1, also termed nanodiscs [8], have been used frequently for biochemical and biophysical studies of membrane proteins and have also been applied for structure determination by single-particle cryo-EM [9–12].

The rationale for the reconstitution of the integral membrane proteins into lipid nanodiscs (ND) is based on the use of a membrane scaffold protein and extra lipids forming the lipid bilayer. Upon detergent removal, the membrane proteins are inserted into a lipid bilayer containing NDs whose size is limited by the membrane scaffold protein (MSP) [13] wrapped around the hydrophobic core of the lipids. A major difficulty of forming protein-ND is the

control of the number of protein molecules per nanodisc. From our previous results, we have observed that this parameter can be tuned by adjusting the lipid to protein ratio but remains tedious to determine because of the system complexity consisting in two proteins that interplay with lipids [14]. Therefore, we explore the formation of a minimal nanodisc without added exogenous lipids.

Here, we present the reconstitution of membrane proteins with the scaffold protein MSP without added extra lipids. We report a methodology to stabilize representatives of  $\beta$ -strand and  $\alpha$ -helical transmembrane proteins with MSP as isolated particles amenable to structural EM studies. This minimal method of the nanodisc formation provides a suitable and straightforward approach for structural studies of individual membrane proteins.

## **2. Methods**

### **2.1 Materials and reagents**

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (USA), sodium cholate hydrate, octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) and *n*-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside (DDM) were purchased from Sigma-Aldrich. SM2 Bio-beads was obtained from Bio-Rad. Superose 6 3.2/300 column was purchased from GE Healthcare. Cu 300 mesh grids and C-flat grids were obtained from Agar Scientific and Protochips respectively.

### **2.2 Lipid preparation**

POPC lipids were dissolved in chloroform, dried onto a glass tube under steady flow of nitrogen and followed by exposure to vacuum for 1 hour. The lipid film was suspended in the reconstitution buffer (100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, pH 7.4 (Buffer 1)) and subjected to five rounds of sonication for 30 seconds each. Lipid concentration was quantified by phosphate analysis.

### **2.3 Protein preparation**

Two membrane scaffold proteins, MSP1D1 and MSP1E3D1 (genetic constructs available from AddGene) were expressed and purified from bacteria [13]. MexB and OprM membrane proteins were expressed and purified from bacteria as previously described for MexB [15], and OprM [16,17]. After purification, protein buffers contained 0.03% *n*-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside for MexB and 0.9 % *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside for OprM.

### **2.4 MSP histidine tag cleavage**

The linker connecting the histidine tag to the MSP protein contains a recognition site for the AcTEV protease enzyme. Digestion of 1 mg of MSP1E3D1 was performed by incubation with 500U of AcTEV (Invitrogen) at room temperature for 5 h, following the manufacturer's protocol. The tag-less protein was obtained in the flow through fraction after passage on a Ni-NTA agarose resin (Invitrogen).

### **2.5 Preparation and purification of MexB-ND, MexB-MSP, OprM-ND and OprM-MSP.**

MexB was inserted into NDs according to the standard protocol [13,14]. Briefly, to obtain MexB-ND, MexB was mixed with POPC and MSP1E3D1 with or without its His-tag, at a final 32:1:0.5 lipid:MSP:protein molar ratio in a 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 mM NaCl buffer with 0.03% DDM and 15 mM Na-cholate (Buffer 2). Unless stated otherwise, molar ratios are calculated based on the monomeric forms of the proteins considered. Detergent was removed by the addition of SM2 Bio-beads into the mixture shaken overnight at 4°C. MexB-MSP was obtained following the same protocol without addition of POPC. Samples were then purified by size exclusion chromatography (SEC) on a Superose 6 column at 40 $\mu$ L/min in buffer 1 or by affinity chromatography using a Ni-NTA agarose resin. In the latter case,

elution in 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 500 mM Imidazole was performed after extensive washing (10CV) to remove excess MSP. Imidazole was then removed by buffer exchange with 10mM Tris/HCl pH 7.4, 100mM NaCl on an amicon ultra 100 000 MWCO by 5 centrifugations at 3000g for 10 min.

For OprM-ND, OprM was mixed with POPC and MSP1D1 at a final 24:1:0.6 lipid:MSP:protein molar ratio in a 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 mM NaCl buffer with 0.9%  $\beta$ -octylglucoside and 15 mM Na-cholate (Buffer 3). Detergent was removed by SM2 Bio-beads overnight at 4°C. OprM-MSP was reconstituted following the same protocol, without addition of lipids. Samples were then purified by SEC on a Superose 6 column at 40 $\mu$ L/min in buffer 1.

An alternative reconstitution of OprM-MSP and MexB-MSP was performed on spin columns. For OprM-MSP, OprM was mixed with MSP1D1 at a final 1:0.6 MSP:protein molar ratio in buffer 3 and incubated with slight agitation for 1h at 4°C. For MexB-MSP, MexB was mixed with MSP1D1 at a final 1:0.5 MSP:protein molar ratio in buffer 2 and incubated with slight agitation for 1h at 4°C. Equilibration of zeba spin desalting columns (MWCO 7K, Thermo Fisher) was achieved by three centrifugations with 300 $\mu$ L of buffer 1 at 2000g for 1min. Then, the reconstitution mixture was applied onto the column and the complex was collected in the flow through after centrifugation for 2min at 2000g.

## **2.6 Protein quantification from SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

Protein samples were boiled for 10min at 100°C in 1X SDS-PAGE reducing buffer and ran for 1h at a constant voltage of 180V on a 12% polyacrylamide gel following the protocol of Laemmli [18]. Protein bands were stained by overnight incubation in SYPRO ruby gel stain solution (Bio-Rad) with slow agitation. Excess background staining was removed by two successive 30min incubations in a solution containing 10% methanol and 7% acetic acid. The

gels were washed one last time in ultrapure water and imaged on a Typhoon 8600 (Molecular dynamics) in fluorescence mode using a green excitation laser ( $\lambda=532\text{nm}$ ) and the Rox 610 BP 30 emission filter at a normal sensitivity.

The quantification of protein bands was achieved using the gel analyzer plugin of the imageJ software for integration of the area under the peaks. Construction of a standard curve using BSA allowed the determination of the samples protein content in micrograms. The corresponding number of moles for each protein was calculated as follows:

$$n_{(\text{MexB})} = \mu\text{g}_{(\text{MexB})} \times 10^{-6} \times F_{(\text{MexB})} / \text{MW}_{(\text{MexB})} \text{ and } n_{(\text{MSP1E3D1})} = \mu\text{g}_{(\text{MSP1E3D1})} \times 10^{-6} \times F_{(\text{MSP1E3D1})} / \text{MW}_{(\text{MSP1E3D1})}$$

where  $F_{(\text{MexB})}$  and  $F_{(\text{MSP1E3D1})}$  are correction factors equal to 0.8 and 1.3 respectively calculated from the ratio of the slopes (s) for the standard curves of MexB, BSA and MSP1E3D1 ( $F_{(\text{MexB})} = s_{(\text{BSA})} / s_{(\text{MexB})} = 0.8$  ;  $F_{(\text{MSP1E3D1})} = s_{(\text{BSA})} / s_{(\text{MSP1E3D1})} = 1.3$ ). Finally, in order to account for the trimeric nature of MexB, we multiplied by 3 the molar ratio of MSP to MexB.

## **2.7 Lipid content characterized by attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)**

Polarized ATR-FTIR spectra were recorded on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Nicolet Instrument) with a spectral resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . MexB samples at  $0.5 \text{ mg/mL}$  were deposited on the crystal in a  $10 \mu\text{L}$  droplet. The surface was washed twice with Tris/HCl  $10\text{mM}$  pH 7.4,  $100\text{mM}$  NaCl and the spectra of the adsorbed molecules were recorded with a parallel (p) and perpendicular (s) polarization of the incident light. The observation of characteristic absorption bands for protein and lipid molecules and comparison of their relative intensities across the different samples allowed for the assessment of lipid content for each specimen.

## 2.8 Negative stain electron microscopy

For EM grid preparation, a diluted mixture of MexB-MSP (at 0.005 mg/ml) or OprM-MSP (at 0.01 mg/ml) samples was applied to a glow-discharged carbon-coated copper 300 mesh grid and stained with 2% uranyl acetate (w/v) solution. Images were recorded under low dose conditions on F20 electron microscope operated at 200kV using a Eagle 4k x 4k camera (FEI). 1902 and 2413 particles were manually picked from 300 and 50 micrographs for MexB and OprM respectively, and image alignment and two-dimensional averages were performed using Eman2.

## 2.9 Single particle cryo-electron microscopy

MexB-MSP was characterized in a second time by single particle analysis in cryo-electron microscopy. Holey carbon grids (300mesh R2/1 C-Flat) were treated with a glow discharge before a deposition of a 3 $\mu$ l aliquot at 4 mg/ml for 1 minute. The grid was blotted for 1s (Whatmann paper ashless 42), rapidly plunged and frozen in liquid ethane using EMGP (Leica) with 5°C controlled temperature and 60% regulated hygrometry. The grids were stored in liquid nitrogen before grid checking and imaging. The data collection of MexB-MSP was carried out automatically on a Polara (FEI) operated at 300kV using K2 Summit direct electron detector (GATAN). A data set of 445 dose fractionated micrographs was recorded in counting mode with a pixel size of 1.21 Å. Each micrograph was collected as 40 movie frames of 0.15 s with a dose rate of 1 e<sup>-</sup> Å<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> each. The total dose was about 40 e<sup>-</sup> Å<sup>-2</sup>. Images were recorded using the automated acquisition program Latitude S from Gatan with defocus values ranging from -1.5 to -3  $\mu$ m.

All movie frames were corrected for gain reference and aligned using Motioncorr2 [19]. Contrast transfer function (CTF) parameters were estimated using Gctf [20]. Further image processing was done in RELION2.1. Initial particle picking consists in a manual-picking of

1181 particles to calculate 2D references. These 2D templates were low-pass filtered to 20 Å to limit reference bias and used for automated picking of all micrographs. A total of 50,722 particles from 233 micrographs was picked. After a 2D classification, 50,522 particles were selected for further analyses. A particle subset was used to calculate a 60 Å low-pass filtered initial model. The 50,522 particles were subjected to 3D classification into 10 classes with no symmetry imposed. Four classes, exhibiting similar structural features and comprising a total of 24,576 particles were subjected to 3D refinements with C1 symmetry. Since MexB has been described as an asymmetric homotrimer, no symmetry was imposed. The resolution estimation calculated onto two separately 3D refined half-reconstructions with the Fourier shell correlation criterion at 0.143 was 8.4 Å for C1 symmetry reconstruction.

### **3 Results**

#### **3.1 Stabilization of a $\alpha$ -helical transmembrane protein with MSP scaffold protein**

We evaluated the ability of MSP1E3D1 to stabilize, in a detergent-free buffer, the MexB drug transporter, as a representative of  $\alpha$ -helical transmembrane protein. In Gram-negative bacteria, MexB forms an asymmetric trimer in which each protomer is made of a 12 transmembrane  $\alpha$ -helices domain and a large periplasmic part comprising a porter and a funnel domain extending 7 nm away from the inner membrane inside the periplasm. We incubated the detergent-purified MexB protein with MSP1E3D1 at a MSP:MexB molar ratio of 2:1 and then proceeded to the detergent removal with Bio-beads. The sample was thereafter submitted to SEC using a buffer without detergent (buffer 1). The SEC profile showed two peaks; the first peak corresponds to the MexB stabilized with MSP (MexB-MSP) whereas the second peak originates from monomeric MSP (Figure 1A). For comparison, a solution of MexB stabilized in a lipid nanodisc (MexB-ND) submitted to SEC exhibited a comparable elution profile suggesting that MexB-MSP and MexB-ND have similar sizes.

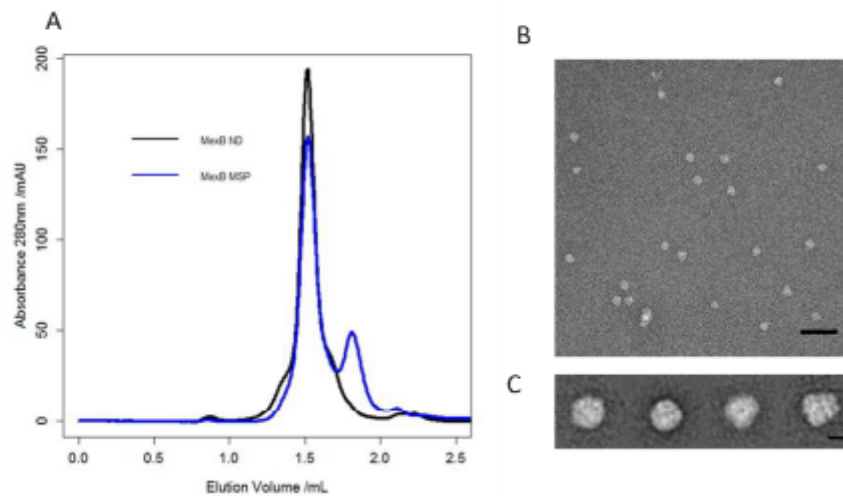


Figure 1: A) Size Exclusion Chromatography elution profiles for MexB-MSP (blue curve) and MexB reconstituted in lipid nanodisc using the same MSP1E3D1 (MexB-ND). For MexB-MSP, an extra peak is observed at 1.8 mL eluted volume, indicating an excess of free MSP. B) Negative stain EM field of the peak at 1.5 mL eluted volume showing homogeneous MexB-MSP particles. Scale bar 50 nm. C) Representative 2D classes of MexB viewed with different orientations. The two average images on the right correspond to top and side views respectively. Scale bars 10 nm.

EM revealed a homogenous population of MexB-MSP molecules (Figure 1B). Averaging 1902 single particles showed side and top views of MexB-MSP in accordance with the trimeric organization of MexB (PDB ID: 2V50) with a continuous layer of electron density for the MSP, including the 36-transmembrane helix domain of trimeric MexB. Furthermore, the periplasmic part of MexB exhibited two clearly distinguishable layers of density, assigned to the porter domain and to the more distal funnel domain (Figure 1C).



### 3.2 Single particle cryo-electron microscopy of MexB-MSP

We used single-particle cryo-EM to determine the structure of MexB-MSP. We prepared cryo-EM grids of the MexB-MSP by the standard plunge-freezing method. Cryo-EM images showed that the frozen hydrated complexes of MexB-MSP were homogeneous and monodisperse (Figure 2A). We collected a relatively modest cryo-EM data set (455 micrographs) as the purpose of this structural study was conceived as a proof of feasibility but not as the elucidation of MexB structure, which is already known [21]. The 2D class averages displayed thin features of the periplasmic and transmembrane domains of MexB-MSP viewed in various orientations (Figure 2B). After 3D classification, four classes comprising a total of 24,576 particles were used to calculate a 3D reconstruction following a gold-standard refinement procedure at a resolution of 8.4 Å (estimated with the criterion of Fourier shell correlation  $FSC = 0.143$ ) (Figures 2C, D, E). The Euler angle distribution showed a good spatial coverage of all particles used in the final map (Figure S1 Supplementary materials). No symmetry was imposed as MexB forms an asymmetric homotrimer [21].

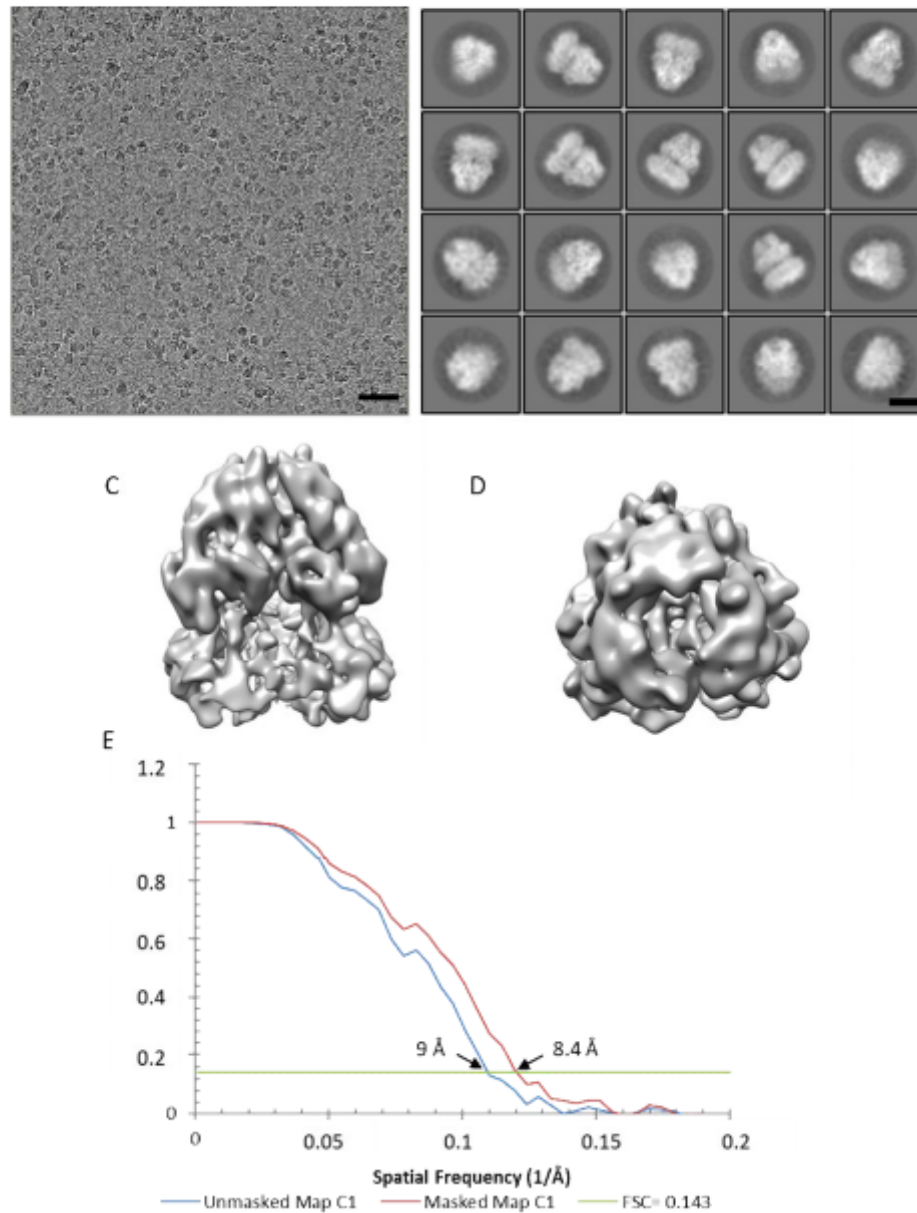


Figure 2: Cryo-EM data and image processing of MexB-MSPE3D1. A) Representative cryo-EM micrograph. Scale bar 50 nm. B) Average images after 2D classification. Scale bar 7 nm. C-D) Side and top views of MexB-MSP cryo-EM reconstruction. E) Resolution curve.

Surface representations of MexB-MSP cryo-EM densities show that the periplasmic core of MexB was better resolved than some domains at the edge of the molecule that seem highly flexible as well as the region that could be attributed to the MSP proteins (Figures 2D-C). The asymmetric MexB crystal structure could be directly fitted within our cryo-EM map without modification. Overall no significant difference was observed between the two structures (Figure 3). The three asymmetric subunits (in access, binding and extrusion conformations as described in the crystal structure [21,22] have been positioned in the C1 cryo-EM map. The secondary structure elements could be assigned within the periplasmic domain which confirms the 8.4 Å resolution. The funnel domains DN and DC were well-accommodated and the  $\alpha$ -helices and loops were clearly defined (Figure 3B) as well as the porter domains PC1 and PC2 (Figure 3C). Transmembrane densities exhibited a good fit with transmembrane helices of the Binding and Extrusion subunits from the crystal structure unlike densities corresponding to those of the Access subunit (Figures 3E, G-I). For the latter, the bundle of helices in the EM map was resolved but a small shift was observed with respect to the helices from the crystal. This structural variation may likely be explained by the use of MSP instead of detergent. Such mobility of the helices was already observed when AcrB, *E. coli* transporter homologous to MexB was solubilized with SMA [23], suggesting the position of the transmembrane helices are slightly modified by the presence of the stabilizing molecules. In addition, extra densities around MexB could correspond to the MSP molecules but poor resolution did not permit to solve the MSP structure (Figures 3E-I). Overall, the C1 cryo-EM map was in good agreement with the crystal structure and the stabilization with MSP did not induce major changes to the global secondary structure in MexB.

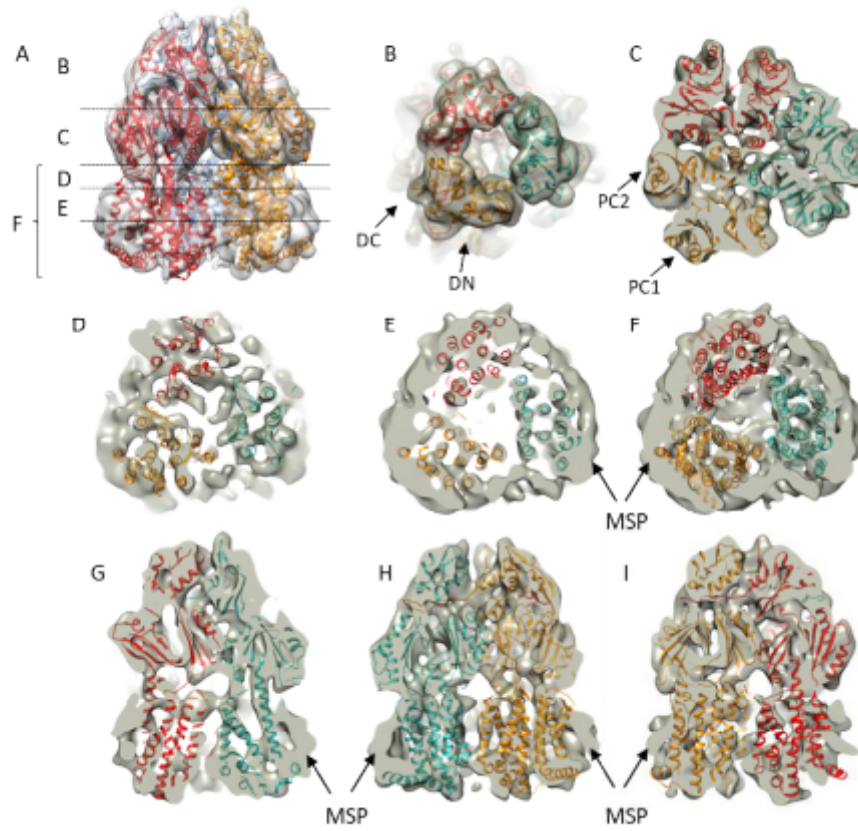


Figure 3: Fitting of MexB crystal structure within the cryo-EM map.

A) Side view of MexB in the cryo-EM map B-F) Transversal sections through the volume showing the fit of each asymmetric subunit colored in red, yellow and blue corresponding to the Access, Binding and Extrusion conformation respectively. Selected position at the level of the funnel domain (B), porter domain (C), transmembrane domain (D-F) marked on A). G-I) Longitudinal sections revealing good fit of transmembrane helices of blue and yellow subunits corresponding to Binding and Extrusion conformations.

### 3.3. Analysis of MexB-MSP stoichiometry

To determine the stoichiometry of MSP bound per MexB trimer within the MexB-MSP complex, we reconstituted MexB-MSP1E3D1 with a MSP devoid of its His-tag and removed the excess of MSP by affinity purification using the His-tag of MexB. SDS-PAGE of purified MexB-MSP with BSA-standards as a reference (Figure 4) suggested a 2:1 ratio of MSP / MexB trimer (Table 1).

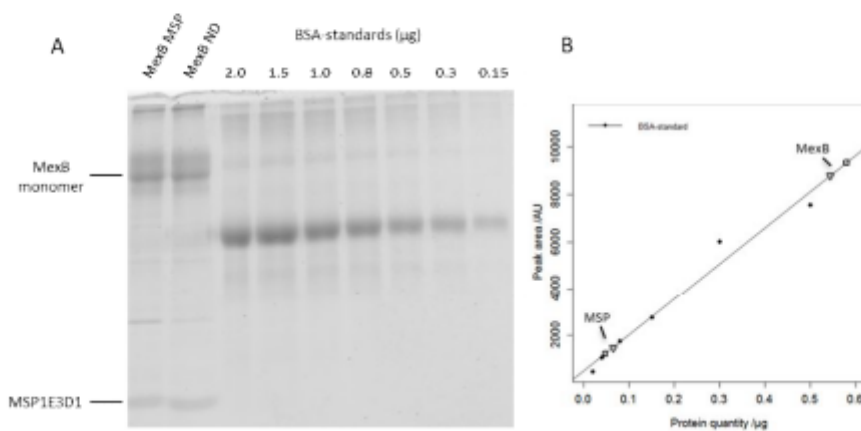


Figure 4: Determination of the molar MSP to MexB ratio by SYPRO ruby quantification.

A) SDS PAGE of MexB-MSP, MexB-ND and BSA-standards. The samples were run on the same gel as the BSA-standards to ensure proper calibration. B) Protein quantities for MexB and MSP1E3D1 were determined for both MexB-ND (triangles) and MexB-MSP (squares) complexes by use of the BSA calibration curve.

Table 1: MSP to MexB trimer molar ratio. Values presented are the average of two independent experiments.

	MSP to MexB molar ratio	
	Mean	SD
MexB ND	1.7	0.3

MexB MSP	1.5	0.2
----------	-----	-----

In this range of concentration, the fluorescence intensities of MexB and MSP1E3D1 were proportional to the amount of protein but differed slightly from the BSA-standards at similar concentrations (Figure S2A Supplementary materials). To get an accurate quantification from the BSA standard curve, an adjustment factor using the ratio of their slopes has been applied as described in Materials and Methods (Figure S2B Supplementary materials). For comparison, a MexB-ND sample prepared in a way similar to that of MexB-MSP showed a comparable stoichiometry suggesting that there are two MSP molecules in both MexB-MSP and MexB-ND complexes (Table 1).

#### 3.4. Characterization of lipid content of MexB-ND and MexB-MSP by ATR-FITR

Given that membrane proteins after purification with detergent may conserve some lipid molecules tightly bound to their transmembrane regions, we sought to evaluate if a large amount of residual lipids could be responsible for MexB stabilization by MSP. To this end, reconstitution of MexB-ND2 was performed with a lipid concentration two fold larger than that of MexB-ND, for a characterization of the lipid content using polarized ATR-FTIR. ATR spectra were collected for MexB-MSP, MexB-ND and MexB-ND2 between  $4000\text{ cm}^{-1}$  and  $600\text{ cm}^{-1}$ . Lipid content was determined by following the absorption bands around  $2923\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  which correspond to the antisymmetric and symmetric  $\text{CH}_2$  stretching modes of the lipid acyl chains respectively (Figure 5). The intensities of the absorption bands are proportional to the molecule concentration and these increased with increasing lipid to protein ratio used for MexB-ND reconstitution. Indeed, a doubling of the lipid to protein ratio resulted in twice as much signal in the  $\text{CH}_2$  region, going from  $2.3 \cdot 10^{-4}$  to  $4.5 \cdot 10^{-4}$  at  $2920\text{ cm}^{-1}$  and from  $1.0 \cdot 10^{-4}$  to  $2 \cdot 10^{-4}$  at  $2850\text{ cm}^{-1}$  for the MexB-ND and MexB-ND2 samples respectively. The presence of amide bands between 1600-1700 (amide I) and

1500-1580 (amide II) clearly demonstrates the presence of the proteins. For all studied samples, comparable intensities were observed, indicating that similar quantities of MexB-ND2 or MexB-ND were adsorbed on the crystal providing further evidence that the difference in signal for the bands at  $2923\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  was due to different lipid concentrations. Specifically, in the vicinity of the wavenumbers where a lipid contribution should appear, MexB-MSP exhibited only background level absorbance intensity revealing the absence of endogenous lipids surrounding its transmembrane region. Interestingly, when more lipids were used for nanodisc reconstitution, i.e. for MexB-ND2, a characteristic band of the ester carbonyl stretching mode appeared at  $1740\text{ cm}^{-1}$  which unequivocally identified the presence of lipids. In conclusion, the MexB-MSP complex was stabilized mainly by direct protein-protein contacts and no significant amounts of leftover lipids were required to accommodate interactions between MexB and its MSP.

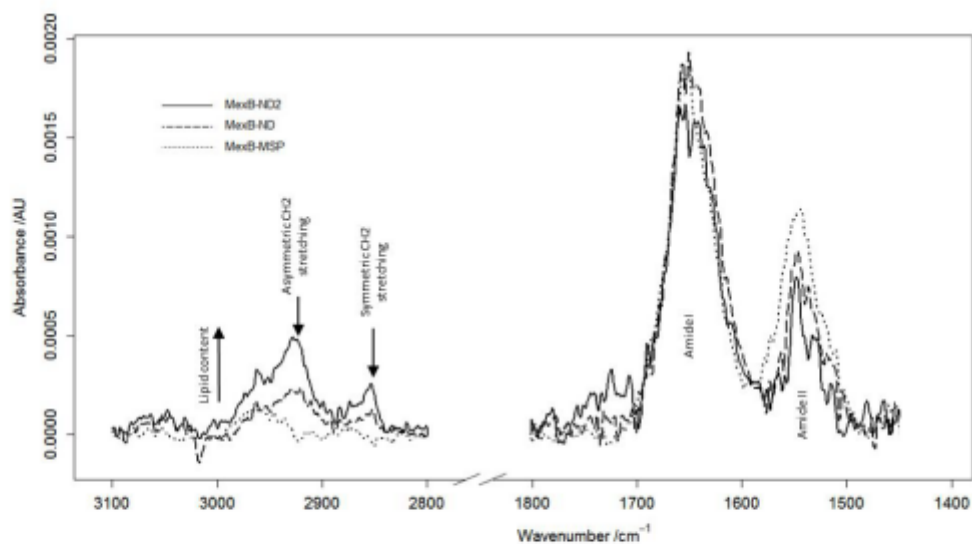


Figure 5: ATR-FTIR characterization of lipid content for MexB reconstituted in ND or with MSP alone.

ATR-FTIR *p*-polarized spectra show the presence of lipids for MexB-ND according to the absorption bands at  $2923\text{ cm}^{-1}$  and  $2850\text{ cm}^{-1}$  (Arrows). Doubling the lipid to protein ratio for MexB-ND reconstitution (MexB-ND2) results in a two-fold increase in the concentration of lipids per nanodisc, as shown by the MexB-ND2/MexB-ND ratio in the CH<sub>2</sub> bands intensity, while the amount of protein adsorbed remains constant as indicated by the intensity of the amide bands (between  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  (amide I) and  $1500\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$  (amide II)). Unlike MexB-ND, the MexB-MSP spectrum shows undetectable amount of endogenous lipids.



### 3.5. Stabilization of a $\beta$ -strand transmembrane protein with MSP scaffold protein

To further determine whether a membrane protein with a smaller transmembrane domain could be stabilized by a MSP alone, we focused on the potential of MSP1D1 to stabilize OprM which possesses a trimeric organization consisting in a  $\beta$ -barrel transmembrane domain of 4-5 nm in diameter. We incubated the detergent-purified OprM protein with MSP1D1 at a MSP:OprM molar ratio of 1:0.6 and then proceeded to remove the detergent with Bio-beads. The SEC profile showed a main peak corresponding to the OprM stabilized with MSP (OprM-MSP) (Figure 6A). OprM reconstituted in lipid nanodisc (OprM-ND) showed a comparable elution profile that appeared thicker than that of OprM-MSP suggesting a higher homogeneity for OprM-MSP. EM analysis of these OprM-MSPs revealed a homogenous population of OprM-MSP molecules with their long axis preferentially oriented parallel to the carbon support which was consistent with the trimeric assembly of OprM (Figure 6B) [24,25]. An average image (from 2413 particles) of OprM-MSP revealed densities related to the MSP at the edge of the duct formed by the OprM  $\beta$ -barrel domain and the 10-nm-long OprM periplasmic domain (Figure 6B, inset). A previous EM characterization of OprM-ND showed also one trimer per ND [14]. Of note, the ND size appeared slightly larger because of the presence of lipids. It appears MSP1D1 without extra lipids also allowed the stabilization of one trimer of OprM.

Our protocol for measuring the OprM/MSP ratio required the removal of the MSP excess using His-tag affinity chromatography and elution of OprM-MSP complexes. Unfortunately, we observed that during this step, a molecular reorganization occurred within these complexes leading to the formation of complexes containing two or three OprM molecules. Therefore, the OprM/MSP ratio has not been determined because the presence of these complexes would have biased the calculation of the number of MSP per OprM trimer. For OprM-ND, the ratio

MSP/OprM indicated that one OprM particle is stabilized by two MSP molecules, like MexB-ND and MexB-MSP (data not shown).

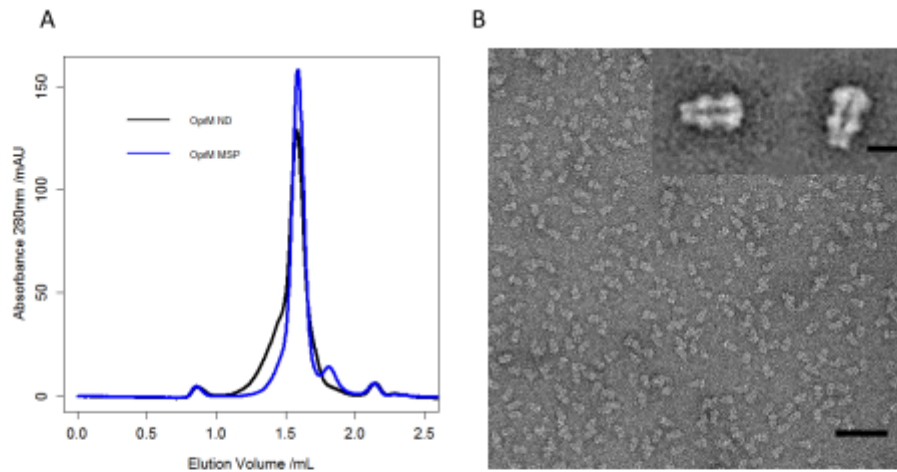


Figure 6: A) Size Exclusion Chromatography elution profiles for OprM-ND and OprM-MSP. In the latter case, an extra peak is observed, indicating an excess of free MSP. Higher molecular weight species are present in the OprM ND reconstitution. B) EM observation of the OprM-MSP fraction shows isolated OprM molecules. Scale bar 50 nm. Inset: Representative class average of OprM negatively stained images. Scale bar 7 nm.

#### 4. Discussion

Nanodiscs currently developed for stabilizing membrane protein in detergent-free buffer use scaffold proteins and extra lipids leading to the formation of a tripartite scaffold-lipid-protein complex [9,26,27]. We have explored the ability of the ApoA1-derived MSP protein to stabilize membrane protein in detergent-free buffer without adding extra lipids for

structural and biophysical studies. The formation of MSP-membrane protein complex was carried out by detergent removal.

We successfully stabilized representatives of both  $\beta$ -barrel and  $\alpha$ -helical membrane proteins with MSP1D1 and MSP1E3D1. We carried out a cryo-EM structure determination of MexB stabilized by MSP indicating that the overall structure of MexB stabilized by MSP resembles the asymmetric crystal structure of MexB in detergent (Figure 3). Our results also provided evidence that trimeric MexB particles were stabilized by two MSP molecules (Figure 4). In pure lipid nanodiscs, it has been proposed that two MSP molecules form a double-belt shielding the acyl chains of the lipid molecules [27–29]. Likewise, cryo-EM density map showed extra densities around the transmembrane domain of MexB. The MSP densities were poorly resolved probably because of an irregular arrangement of MSP molecules. However, their disposition strongly suggests that the MSP proteins are wrapped around MexB. Moreover, the similar sizes obtained for pure lipid nanodiscs and MexB-MSP suggest a similar arrangement of the scaffolding protein, in a double belt-like pattern, as previously proposed [29].

The stabilization of OprM has been achieved with MSP1D1. The choice of this MSP was driven by our previous data on the formation of OprM-ND [14]. We had been able to reconstitute OprM in nanodisc using this MSP. Therefore, we used the same MSP to stabilize OprM without extra lipids. The EM results after size exclusion chromatography show a homogeneous distribution of OprM molecules (Figure 6). These results indicate that the MSP on its own with no extra lipids, is able to maintain the stability and monodispersity of membrane proteins in a detergent-free buffer even for proteins harboring a rather small transmembrane domain (5 nm in diameter for OprM). It can be assumed that MSP molecules adopt an organization that encircles OprM, as for MexB. Given the MSP flexibility revealed by the cryo-EM structure of MexB-MSP, we expect similar variabilities in MSP structural

arrangements around OprM which would hamper the determination of its organization by single particle cryo-EM explaining why we did not pursue further cryo-EM structural investigation.

Stabilizing membrane proteins with MSP in the absence of lipids presents several advantages. First, defining the MexB/MSP ratio to get one trimeric MexB particle per complex seems rather straightforward. As long as MSP is present in a little excess, MexB will be well stabilized. In our experiments, we have used a MSP/MexB ratio of 2. There is no need to add a larger excess of MSP. In the case of lipid nanodisc formation, the addition of lipids may affect the number of MexB protein per ND inducing a certain heterogeneity [30]. This explains why the lipid to protein ratio needs to be finely adjusted to maintain one molecule of MexB per ND. Secondly, the method for removing detergent classically uses polystyrene beads. Another method has also been explored with the use of spin column. The advantage of this method is a much quicker detergent removal than with the Bio-beads. The stabilization of OprM and MexB has been performed with the MSP1D1 and the samples were observed by electron microscopy (Figure S3 Supplementary materials). Both OprM and MexB samples looked homogeneous and similar to those prepared with Bio-beads. For the formation of lipid nanodisc, the rate of detergent removal is important for the bilayer reconstitution. Altogether, the stabilization of membrane proteins with MSP in the absence of additional lipids appears less restrictive.

The ability of scaffolding systems to stabilize membrane proteins without adding extra lipids has been proposed for engineered peptides forming  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices. Such stabilization was successful for the MsbA transporter, rhodopsin and bacteriorhodopsin that are  $\alpha$ -helical integral membrane proteins but failed for the  $\beta$ -barrel PhoE porin [3,4]. Very recently a bi-helical peptide has been developed with the ability to stabilize both  $\alpha$ -helical and

$\beta$ -barrel membrane proteins [31]. Our results extend this approach to the use of proteins such as MSP containing several helical segments without the need for peptide engineering.

Even though our cryo-EM structure of MexB-MSP revealed the asymmetric structure of MexB encircled by densities attributable to the MSP, it did not permit to describe the interactions of MSP with MexB. Nevertheless, these densities were located in the close vicinity of MexB suggesting a direct interaction of MSP with MexB. This hypothesis is supported by ATR results showing no detectable lipid content associated with MexB (Figure 5), although it cannot be excluded that a few lipids remained strongly bound the membrane protein after its purification and may help its stabilization with the scaffolding protein.

## **5. Conclusions**

Our protocol opens the use of MSP for stabilizing membrane protein without adding extra lipids. This method is less restrictive than that for preparing lipid nanodisc in terms of MSP to protein ratio optimization, detergent removal or even the choice of MSP length. Membrane proteins are well maintained as isolated particles amenable to single particle cryo-EM structural studies. As a scaffold protein, the same MSP can be used with or without extra lipids for stabilizing membrane proteins. This versatile property may emerge as a valuable advantage to use a unique scaffold system instead of several for biochemical, structural and pharmacological characterizations.

## **Acknowledgments**

This work was supported by French national agency ANR (Assembly ANR-17CE11-0028), Bordeaux INP and Conseil Régional d'Aquitaine. This work has benefited from the

facilities of UMS3033/US001 (<http://www.iecb.u-bordeaux.fr/index.php/fr/plateformestecnologiques>) and used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10 INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscope facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA). DS is recipient of a MENRT fellowship. MG is recipient of a fellowship from Bordeaux-INP and Conseil Régional d'Aquitaine. We thank C. Gounou for technical assistance.

#### **Author contributions**

OL, LD, DS, MG designed the project, analysed data and wrote the manuscript. DS, MG, GS carried out experiments. IB, GP, CG developed expression and protein purification protocols. SL advised on ATER experiment. MD, JCT assisted with electron microscopy and image analysis.

#### **Competing financial interests:**

The authors declare no competing financial interests.

## References

- [1] C. Tribet, R. Audebert, J.L. Popot, Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 15047–15050.
- [2] T.J. Knowles, R. Finka, C. Smith, Y.-P. Lin, T. Dafforn, M. Overduin, Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 7484–7485. doi:10.1021/ja810046q.
- [3] C.E. Schafmeister, L.J. Miercke, R.M. Stroud, Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins, *Science*. 262 (1993) 734–738.
- [4] H. Tao, S.C. Lee, A. Moeller, R.S. Roy, F.Y. Siu, J. Zimmermann, R.C. Stevens, C.S. Potter, B. Carragher, Q. Zhang, Engineered nanostructured  $\beta$ -sheet peptides protect membrane proteins, *Nat. Methods*. 10 (2013) 759–761. doi:10.1038/nmeth.2533.
- [5] A.N. Larsen, K.K. Sørensen, N.T. Johansen, A. Martel, J.J.K. Kirkensgaard, K.J. Jensen, L. Arleth, S.R. Midtgaard, Dimeric peptides with three different linkers self-assemble with phospholipids to form peptide nanodiscs that stabilize membrane proteins, *Soft Matter*. 12 (2016) 5937–5949. doi:10.1039/c6sm00495d.
- [6] T.H. Bayburt, J.W. Carlson, S.G. Sligar, Reconstitution and imaging of a membrane protein in a nanometer-size phospholipid bilayer, *J. Struct. Biol.* 123 (1998) 37–44. doi:10.1006/jsbi.1998.4007.
- [7] J. Frauenfeld, R. Löving, J.-P. Armache, A.F.-P. Sonnen, F. Guettou, P. Moberg, L. Zhu, C. Jegerschöld, A. Flayhan, J.A.G. Briggs, H. Garoff, C. Löw, Y. Cheng, P. Nordlund, A saposin-lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins, *Nat. Methods*. 13 (2016) 345–351. doi:10.1038/nmeth.3801.
- [8] T.H. Bayburt, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar, Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs, *Arch. Biochem. Biophys.* 450 (2006) 215–222. doi:10.1016/j.abb.2006.03.013.
- [9] J. Frauenfeld, J. Gumbart, E.O. van der Sluis, S. Funes, M. Gartmann, B. Beatrix, T. Mielke, O. Berninghausen, T. Becker, K. Schulten, R. Beckmann, Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 614–621. doi:10.1038/nsmb.2026.
- [10] R.G. Efremov, A. Leitner, R. Aebersold, S. Raunser, Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor, *Nature*. 517 (2015) 39–43. doi:10.1038/nature13916.
- [11] Y. Gao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action, *Nature*. 534 (2016) 347–351. doi:10.1038/nature17964.
- [12] P. Jin, D. Bulkley, Y. Guo, W. Zhang, Z. Guo, W. Huynh, S. Wu, S. Meltzer, T. Cheng, L.Y. Jan, Y.-N. Jan, Y. Cheng, Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC, *Nature*. 547 (2017) 118–122. doi:10.1038/nature22981.
- [13] T.K. Ritchie, Y.V. Grinkova, T.H. Bayburt, I.G. Denisov, J.K. Zolnerciks, W.M. Atkins, S.G. Sligar, Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs, *Methods Enzymol.* 464 (2009) 211–231. doi:10.1016/S0076-6879(09)64011-8.
- [14] L. Dauray, F. Orange, J.-C. Taveau, A. Verchère, L. Monlezun, C. Gounou, R.K.R. Marreddy, M. Picard, I. Broutin, K.M. Pos, O. Lambert, Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10731. doi:10.1038/ncomms10731.

- [15] V. Mokhonov, E. Mokhonova, E. Yoshihara, R. Masui, M. Sakai, H. Akama, T. Nakae, Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 91–100. doi:10.1016/j.pep.2004.10.002.
- [16] Y. Ferrandez, M. Dezi, M. Bosco, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, C. Le Bon, F. Giusti, I. Broutin, G. Durand, A. Polidori, J.-L. Popot, M. Picard, P. Minard, Amphipol-mediated screening of molecular orthoses specific for membrane protein targets, *J. Membr. Biol.* 247 (2014) 925–940. doi:10.1007/s00232-014-9707-3.
- [17] G. Phan, H. Benabdelhak, M.-B. Lascombe, P. Benas, S. Rety, M. Picard, A. Ducruix, C. Etchebest, I. Broutin, Structural and dynamical insights into the opening mechanism of *P. aeruginosa* OprM channel, *Struct. Lond. Engl.* 18 (2010) 507–517. doi:10.1016/j.str.2010.01.018.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685.
- [19] X. Li, P. Mooney, S. Zheng, C. Booth, M.B. Braunfeld, S. Gubbens, D.A. Agard, Y. Cheng, Electron counting and beam-induced motion correction enable near atomic resolution single particle cryoEM, *Nat. Methods.* 10 (2013) 584–590. doi:10.1038/nmeth.2472.
- [20] K. Zhang, Gctf: Real-time CTF determination and correction, *J. Struct. Biol.* 193 (2016) 1–12. doi:10.1016/j.jsb.2015.11.003.
- [21] G. Sennhauser, M.A. Bukowska, C. Briand, M.G. Grütter, Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Mol. Biol.* 389 (2009) 134–145. doi:10.1016/j.jmb.2009.04.001.
- [22] R. Nakashima, K. Sakurai, S. Yamasaki, K. Hayashi, C. Nagata, K. Hoshino, Y. Onodera, K. Nishino, A. Yamaguchi, Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters, *Nature.* 500 (2013) 102–106. doi:10.1038/nature12300.
- [23] M. Parmar, S. Rawson, C.A. Scarff, A. Goldman, T.R. Dafforn, S.P. Muench, V.L.G. Postis, Using a SMALP platform to determine a sub-nm single particle cryo-EM membrane protein structure, *Biochim. Biophys. Acta.* 1860 (2018) 378–383. doi:10.1016/j.bbamem.2017.10.005.
- [24] H. Akama, M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, A. Nakagawa, T. Nakae, 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 (2004) 52816–52819. doi:10.1074/jbc.C400445200.
- [25] O. Lambert, H. Benabdelhak, M. Chami, L. Jouan, E. Nouaille, A. Ducruix, A. Brisson, Trimeric structure of OprN and OprM efflux proteins from *Pseudomonas aeruginosa*, by 2D electron crystallography, *J. Struct. Biol.* 150 (2005) 50–57. doi:10.1016/j.jsb.2005.01.001.
- [26] F. Hagn, M. Etkorn, T. Raschle, G. Wagner, Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 1919–1925. doi:10.1021/ja310901f.
- [27] I.G. Denisov, S.G. Sligar, Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics, *Chem. Rev.* 117 (2017) 4669–4713. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00690.
- [28] Y. Li, A.Z. Kijac, S.G. Sligar, C.M. Rienstra, Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* 91 (2006) 3819–3828. doi:10.1529/biophysj.106.087072.
- [29] S. Bibow, Y. Polyhach, C. Eichmann, C.N. Chi, J. Kowal, S. Albiez, R.A. McLeod, H. Stahlberg, G. Jeschke, P. Güntert, R. Rick, Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (2017) 187–193. doi:10.1038/nsmb.3345.



- [30] L. Daury, J.-C. Taveau, D. Salvador, M. Glavier, O. Lambert, Reconstitution of Membrane Proteins into Nanodiscs for Single-Particle Electron Microscopy, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 1635 (2017) 317–327. doi:10.1007/978-1-4939-7151-0\_17.
- [31] M.L. Carlson, J.W. Young, Z. Zhao, L. Fabre, D. Jun, J. Li, J. Li, H.S. Dhupar, I. Wason, A.T. Mills, J.T. Beatty, J.S. Klassen, I. Rouiller, F. Duong, The Peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution, *ELife*. 7 (2018). doi:10.7554/eLife.34085.

## Minimal nanodisc without exogenous lipids for stabilizing membrane proteins in detergent-free buffer

Dimitri Salvador<sup>1,25</sup>, Marie Glavier<sup>1,2,5</sup>, Gilles Phan<sup>3</sup>, Guy Schoehn<sup>4</sup>, Jean-Christophe Taveau<sup>1,2</sup>, Marion Decossas<sup>1,2</sup>, Sophie Lecomte<sup>1,2</sup>, Cyril Garnier<sup>3</sup>, Isabelle Broutin<sup>3</sup>, Lactitia Daury<sup>1,25</sup>, Olivier Lambert<sup>1,23</sup>

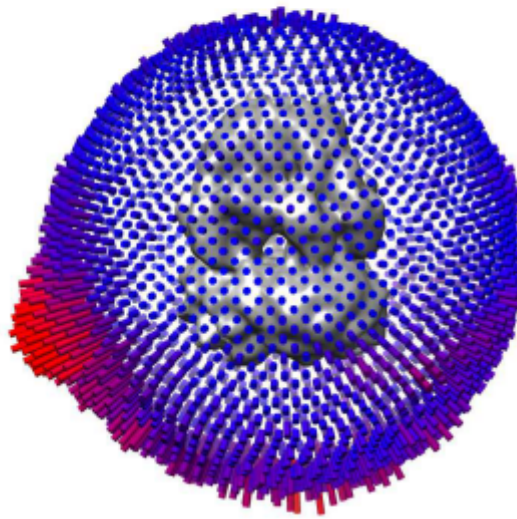


Figure S1: Representation of Euler angle distribution from images used to calculate the 3D reconstruction of MexB-MSP

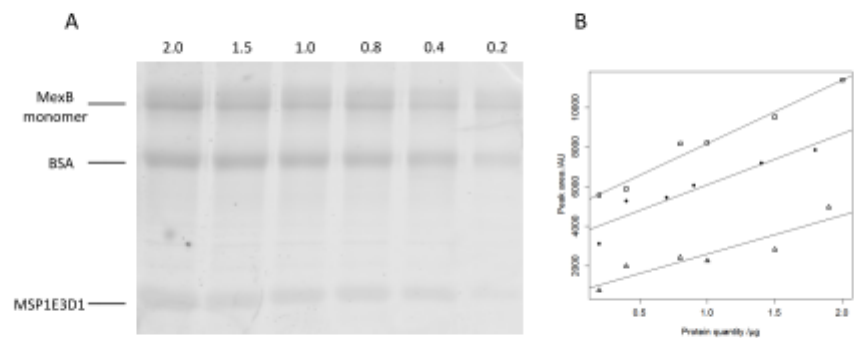


Figure S2-A) SDS PAGE of pure MexB, BSA and MSP1E3D1 for SYPRO ruby quantification. B) Calibration curves. Equal quantities of MexB, BSA and MSPE31D1 result in different calibration curves which would hamper accurate measurements when BSA is used as the reference. To correct for this effect, the ratios of the slope for each protein to that of BSA is determined and used as a correction factor in the equation for the calculation of its number of moles, see materials and methods for precisions (MSP: triangles, BSA: full circles, MexB: squares).

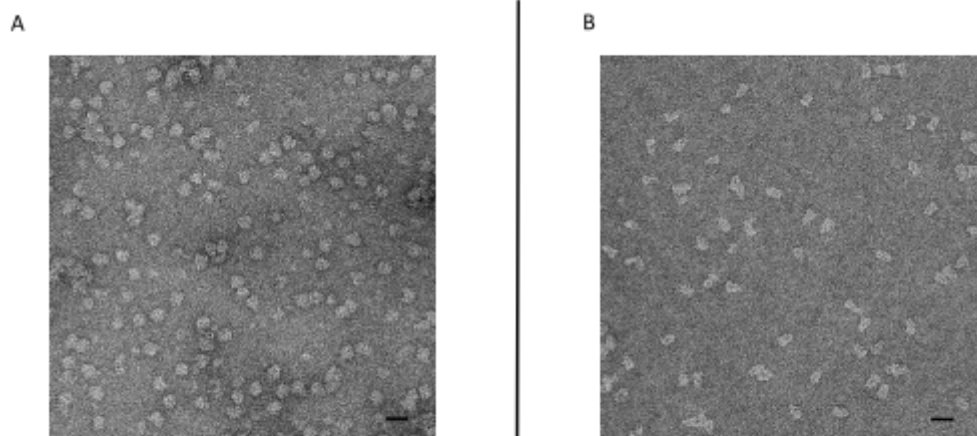


Figure S3: Reconstitution of OprM and MexB-MSP on spin columns. Reconstitution mixtures were first incubated with agitation for 1h and then underwent a 2min centrifugation on spin column with a 7K MWCO. Representative negative stain EM fields are shown for MexB-MSP (A) and OprM-MSP (B). The samples present a homogeneous distribution of stable particles identical to those observed for other reconstitution methods. Scale bars 20nm.





## Chapitre 4 :

### Paramètres influant l'assemblage tripartite.

Une compréhension plus fine des paramètres physico-chimiques affectant la capacité des protéines MexA, MexB et OprM à former un assemblage tripartite est nécessaire à la conception de molécules qui pourraient l'inhiber. A ce titre j'ai réalisé des expériences pour identifier les paramètres clés régissant la formation du complexe tripartite. L'analyse par ME n'apportant qu'une information qualitative, j'ai ensuite commencé à développer des protocoles d'analyses biochimiques ou biophysiques qui permettraient de fournir une information quantitative précise pour discriminer les conditions favorisant ou non l'assemblage du complexe. Dans le cas où des candidats inhibiteurs de l'assemblage seraient découverts, ces techniques quantitatives pourraient offrir un test de criblage efficace.

#### A) Paramètres thermodynamiques et leur influence sur la formation du complexe MexAB-TolC.

Le criblage de conditions qui permettraient d'améliorer le rendements de formation des complexes tripartites s'est en premier lieu concentré sur un rapprochement des conditions d'expériences *in vitro* vis-à-vis des paramètres du milieu périplasmique avant de s'élargir sur la base de considérations plus générales. Les rendements sont ici estimés par la moyenne de comptages des complexes tripartites présents sur les grilles de microscopie (20 images sur 2 carreaux différents).

L'incubation de mélanges MexAB-OprM en présence d'un substrat du transporteur RND, le méropénem, n'a pas stimulé la formation de complexes tripartites. Des essais ont été entrepris à pH acide, par dialyse du mélange contre un Tampon à pH 6, reflétant mieux les conditions physiologiques du périplasme bactérien et favorisant l'interaction avec OprM (Reffay et al., 2009). Cependant les images de microscopie électronique ne révèlent pas une plus grande quantité de pompes que pour les mélanges à pH 7,4. Par ailleurs, dans ces conditions, la neutralisation progressive des charges de certains acides aminés des MSP qui ceinturent les nanodisques entraînent une perte de stabilité colloïdale et la formation d'agrégats. L'outil nanodisque n'est pas bien adapté aux pH faiblement acides. La préparation de mélanges directement dans un Tampon à pH 7, afin de garantir la stabilité des espèces en solution n'a pas eu d'effet significatif.

La conformation en solution de la protéine adaptateur MexA pouvant éventuellement modifier son affinité pour ses partenaires, l'ajout d'ions magnésium à 5 mM dans le mélange, ions divalents dont il a été suggéré qu'ils pouvaient modifier la conformation d'AcrA (Zgurskaya et Nikaido, 1999), n'a pas permis d'améliorer le rendement de formation d'assemblages tripartites. De plus, le retrait progressif du détergent par ajout de cyclodextrine dans le mélange afin de favoriser les interactions entre MexA et les autres partenaires, en particulier MexB, par insertion dans son nanodisque, n'a pas conduit à un meilleur rendement. Au contraire cette molécule semble avoir déstabilisé les nanodisques.



Composition	Ratio Mexb:OprM:MexA	Température	pH	Methyl- $\beta$ -cyclodextrine	Nombre moyen de pompes / champs
MexAB-OprM	1:1:10	4°C	7,4	-	3
MexAB-OprM	1:1:10	25°C	7,4	-	13
MexAB-OprM	1:1:10	30°C	7,4	-	11
MexAB-OprM	1:1:10	37°C	7,4	-	1
MexAB-OprM	1:1:20	25°C	7,4	-	20
MexAB-OprM	1:1:30	25°C	7,4	-	10
MexAB-OprM	1:1:20	25°C	6	-	12
MexAB-OprM	1:1:20	25°C	7,4	+	10
MexAB-OprM (5mM MgCl <sub>2</sub> )	1:1:10	25°C	7,4	-	10
MexAB-OprM	1:2:20	25°C	7,4	-	14
MexAB-OprM	2:1:20	25°C	7,4	-	12
MexAB-OprM (Meropenem)	1:1:20	25°C	7,4	-	16

Tableau 1 : Criblage des conditions de production des complexes tripartites MexAB-OprM. Un comptage du nombre moyen de complexes observés sur une grille de ME permet d'estimer le rendement de formation des complexes.

Ensuite l'influence de la température sur le mélange a été analysée en comparant la quantité de pompes obtenue après une semaine d'incubation à 37 °C, 30 °C, 25 °C ou à 4 °C. Les températures basses, comme attendu, défavorisent la production de complexes tripartites, probablement par un simple effet cinétique, cette dernière dépendant de la température et diminuant à mesure que diminue la température d'incubation. Il y a peu de différence entre des mélanges incubés à 25 °C ou 30 °C. En revanche, une élévation supplémentaire de température, à 37°C, défavorise la formation de complexes. Bien qu'une telle température corresponde à l'optimum de croissance pour les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, *in vitro*, la déstabilisation des protéines membranaires qu'elle engendre, la fluidité accrue de la bicouche lipidique enserrée par le nanodisque ainsi que l'amplification des effets hydrophobes

favorisant l'apparition d'agrégats, sont autant de facteurs qui contribuent vraisemblablement à la diminution du rendement de formation des complexes dans ce cas. Les meilleurs résultats sont obtenus à température ambiante, entre 25 °C et 30 °C.

Enfin, la force ionique est une autre variable à prendre en compte et des essais à 100 mM de NaCl ou sans sels ont montré qu'une force ionique nulle avait un effet délétère sur la formation de complexe.

Pour finir, les différences les plus importantes sont observées lorsque les ratios entre les différents partenaires sont modifiés. En effet, l'augmentation des proportions de MexB ou OprM soit n'ont aucun effet sur la quantité finale de complexes tripartites ou bien la diminue. Ceci indique que ces deux protéines ne sont pas limitantes dans nos conditions pour la formation de complexes tripartites. En revanche l'augmentation de la proportion de MexA dans le mélange, passant d'un ratio OprM:MexB:MexA 1:1:10 à un ratio 1:1:20 permet toujours d'obtenir d'avantage de complexes, d'une quantité deux fois plus importante dans le meilleur des cas. Néanmoins, un ratio 1:1:30 n'améliore plus le rendement de formation de pompes.

Il est logique qu'un ratio favorisant l'excès de PAP entraîne une plus grande quantité d'assemblages tripartites produits car la stœchiométrie de la structure finale nécessite la présence de six monomères de PAP pour chaque trimère des deux autres partenaires. C'est donc cette protéine qui est limitante pour la production de complexes. Cependant, la démesure des excès molaires nécessaires à la formation efficace d'assemblages tripartites peut s'expliquer du fait de la séquestration de molécules de PAP dans des formes improductives (Figure 41). En effet, les surfaces cytosoliques des nanodisques MexB, c'est-à-dire celles qui

ne contiennent pas l'excroissance périplasmique, sont en mesure de permettre l'insertion de nombreuses molécules de PAP qui seront perdues pour la formation des complexes. Il est aussi envisageable qu'il existe un équilibre dynamique entre différentes conformations ou différents multimères de cette protéine qui réduisent encore la proportion de molécules efficaces pour l'assemblage tripartite. Cette deuxième hypothèse est partiellement confirmée par la réduction du rendement lorsque le ratio molaire augmente encore pour atteindre 1:1:30. En somme, le ratio molaire calculé sur la base de la concentration de la protéine MexA pure est une surestimation du ratio effectif en solution.

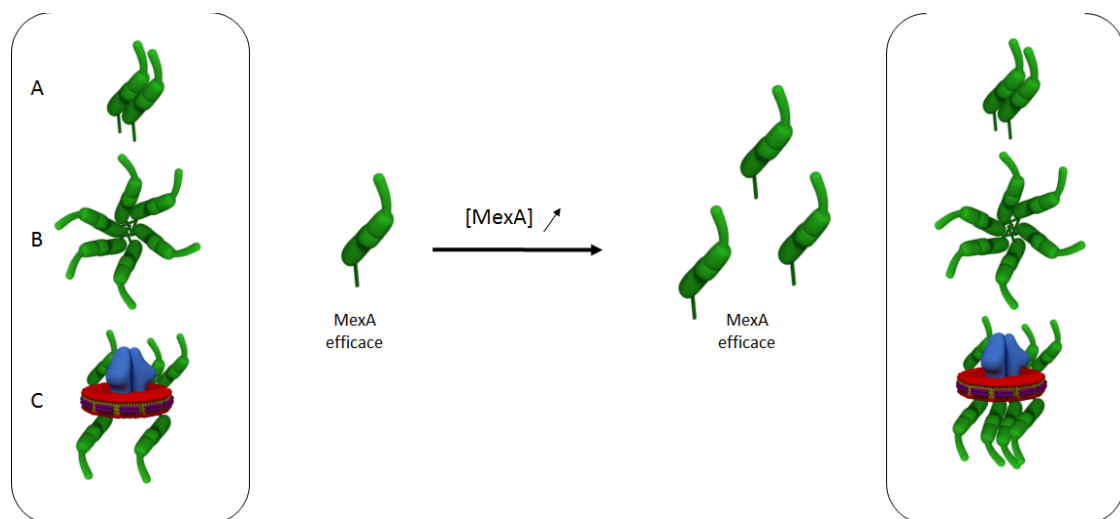


Figure 41 : Un excès de MexA favorise la formation de complexes par enrichissement d'une population soluble et active de la protéine. MexA peut adopter plusieurs arrangements improductifs : oligomères non réactifs (A), agrégats (B), insertion dans la face cytosolique du MexB-ND (C). L'augmentation de la concentration totale en MexA augmente la quantité de protéine compétente pour réaliser l'assemblage tripartite.

Ces expériences permettent de définir les conditions optimales de productions de pompes et les principaux paramètres entrant en jeu dans la formation in vitro du complexe tripartite.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour une température ambiante, une force ionique au moins égale à 0,1 M, et un ratio MexAB-OprM de 20:1:1, aboutissant à une moyenne de 20 pompes par champs.

## B) Influence des lipides sur l'assemblage tripartite et mise au point de techniques d'analyse quantitative de la formation du complexe tripartite.

La présence d'une modification post-traductionnelle qui ancre la PAP dans la membrane interne par acylation de son N-terminal pose question quant à l'utilité et la nécessité de cette stratégie conservée par la bactérie. Bien que des expériences *in vivo* semblent indiquer que l'ancre lipidique ne soit pas utile au fonctionnement de la pompe à efflux, expériences dans lesquelles l'acylation post-traductionnelle est abolie par mutation de la cystéine en une phénylalanine, ou par remplacement du N-terminal clivé au cours de l'acylation au moyen d'une séquence peptidique assurant l'adressage de la protéine dans le périplasme sans pour autant permettre sa modification post-traductionnelle (Yoneyama 1999), le recours à un MexA non palmitoylé (production de MexA amputé des 24 premiers acides aminés) ne m'a jamais permis de réaliser un complexe tripartite *in vitro*. Ce résultat est en accord avec les expériences de SPR qui indiquaient que la dimérisation de AcrA déclenchée par la présence de l'ancre lipidique était nécessaire à l'interaction entre la PAP et ses partenaires (Tikhonova 2011).

## B.1 Effets de l'utilisation de lipides endogènes.

L'hypothèse selon laquelle l'ancre lipidique permet d'associer à la membrane interne le domaine Membrane Proximal de la PAP qui établirait avec celle-ci des interactions privilégiées propose que la nature des lipides qui la composent peuvent avoir une importance pour la structuration du MexA. Dans le chapitre précédent les assemblages étaient formés à partir de nanodisques de POPC. Néanmoins, la membrane interne de bactéries est principalement composée de POPE 80%, POPG 10% et cardiolipides 10% (Shokri 2004). Les protéines MexB et OprM ont donc fait l'objet d'une reconstitution en nanodisques en présence d'extrait de lipides polaires d'*E. coli* selon le protocole décrit précédemment. Ces nanodisques sont identiques à ceux reconstitués avec des POPC par leur structure telle qu'observée en ME en coloration négative et leur profil d'élution sur SEC. L'observation par ME en coloration négative de mélanges MexAB-OprM a révélé la présence de complexes tripartites de structure identique à celle obtenue avec des nanodisques contenant des POPC (Figure 42). Par ailleurs, le rendement de formation des pompes à efflux n'est pas affecté par cette modification de composition lipidique.

Ce résultat indique que les lipides POPC miment aussi efficacement les propriétés de la membrane bactérienne que les lipides polaires d'*E. coli* ce qui exclut un potentiel biais expérimental induit par l'utilisation de lipides synthétiques étrangers aux membranes bactériennes.

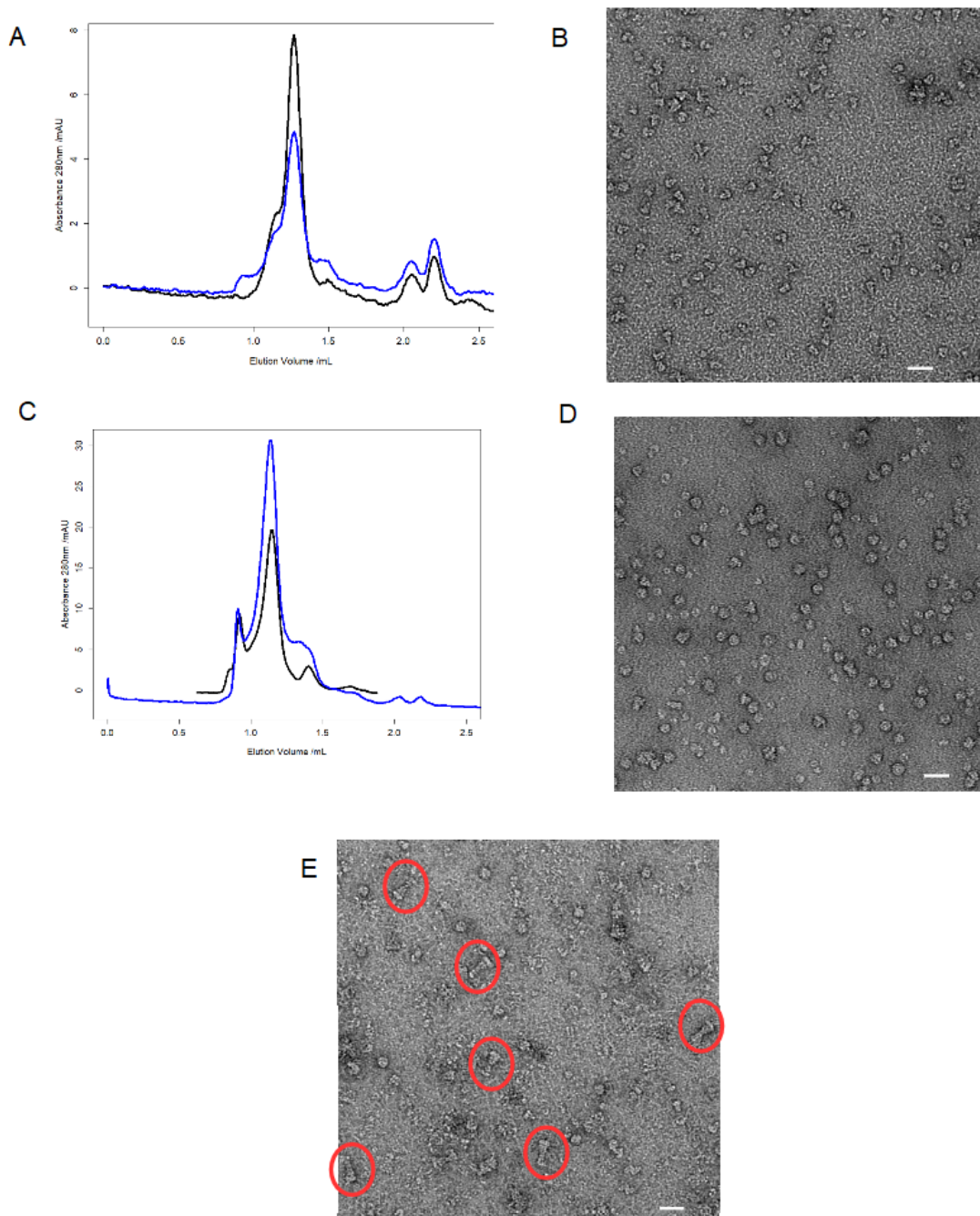


Figure 42 : Les lipides endogènes d'*E.coli* entraînent la formation d'assemblages classiques. A- Comparaison des chromatogrammes de MexB-ND reconstitués avec des lipides d'*E. coli* (noir) ou POPC (bleu). La nature des lipides n'affecte en rien le processus de reconstitution. B-Observation en ME coloration négative de la fraction du pic principal. Les MexB-ND *E. coli* présentent l'aspect structural attendu et identique aux MexB-ND POPC. C et D- idem A et B mais pour le cas OprM. E- L'incubation de ces MexB-ND avec OprM-ND et MexA en détergent entraîne l'apparition de nombreux complexes tripartites de 30 nm de long (cercles rouges). Les lipides endogènes n'ont aucun effet discernable sur la production de ces assemblages tripartites. Barre d'échelle 30 nm.

## B.2 Stabilisation des protéines membranaires par Amphipols et formation du complexe tripartite.

L'opportunité offerte par le polymère Amphipol A8-35 de stabiliser le transporteur MexB sans phase lipidique a permis d'étudier le rôle de la présence de lipides pour la formation du complexe tripartite. Ainsi, MexB et OprM ont été reconstitués en Amphipols par incubation en présence d'un excès massique d'A8-35 égal à 2, puis retrait du détergent au moyen de Biobeads (Figure 43).

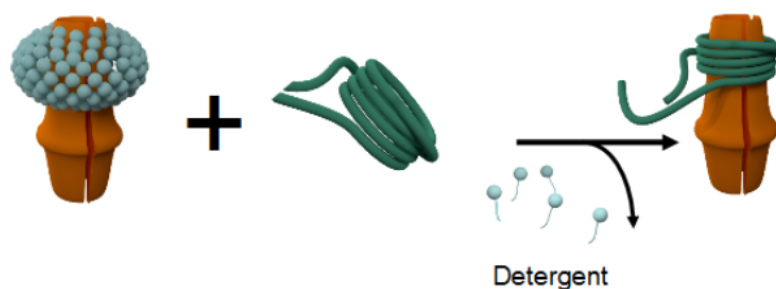


Figure 43 : Schéma général de reconstitution en Amphipol. Par exemple, la protéine OprM pure en détergent est incubée en présence d'Amphipols A8-35 dans un ratio massique 1:2 OprM:APOL. Le retrait du détergent par les biobeads entraîne la formation spontanée d'une ceinture d'APOL autour des parties hydrophobes de la protéine.

L'excès d'Amphipol et le détergent résiduel ont été retirés par chromatographie d'exclusion stérique. Celle-ci présente des chromatogrammes très similaires à ceux observés dans le cas de reconstitution de ces protéines en nanodisques et leur aspect en ME en coloration négative le confirme. Les images moyennes réalisées sur ces objets sont elles aussi semblables à celles de leurs homologues reconstitués en nanodisque (Figure 44). Dans les deux cas les densités autour des parties transmembranaires des protéines ont une apparence

similaire, le polymère formant une « bouée » de taille comparable à celle du nanodisque.

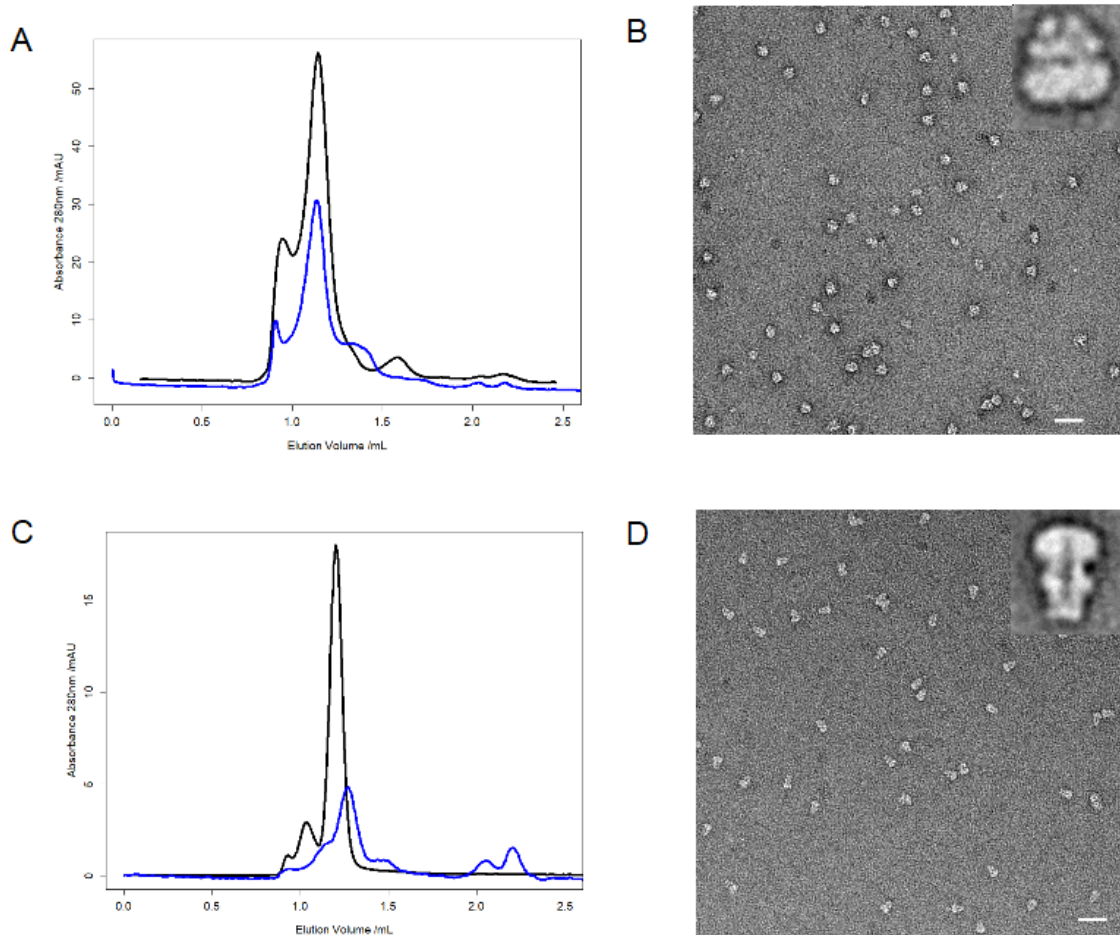


Figure 44 : Reconstitution des protéines OprM et MexB en Amphipols. A et C- Les chromatogrammes de MexB-ND (A, bleu) ou OprM-ND (C, bleu) sont similaires à ceux de MexB-APOL (A, noir) et OprM-APOL (C, noir). B et D- Observations en ME en coloration négative des objets MexB-APOL (B) et OprM-APOL (D). Les encarts présentent des images moyennes obtenues pour 6000 et 4000 particules de MexB et OprM respectivement.



La réalisation de mélanges MexAB-OprM tel que décrit au chapitre précédent, dans lesquels MexA est la protéine pure ajoutée avec son détergent, MexB est stabilisé en nanodisque et OprM est stabilisé par des Amphipols, a permis l'observation de complexes tripartites par ME en coloration négative. Une image moyenne a pu être obtenue pour ce complexe qui confirme que ce dernier a une organisation structurale identique au complexe obtenu en présence de protéines reconstituées en nanodisques (Figure 45). Ceci a permis de vérifier que le polymère lui-même n'est pas un frein à la formation de l'assemblage tripartite, même en présence de détergent qui par un phénomène d'échange peut libérer en solution des molécules d'amphipols qui stabilisaient au départ l'OprM. A ce titre, ces expériences montrent aussi que les concentrations en détergent utilisées pour maintenir soluble la protéine MexA n'ont pas d'effet délétère sur la stabilité de OprM-APOL. Ensuite, la réalisation de mélanges contenant MexB et OprM reconstitués en amphipols avec ajout de MexA pur en détergent n'a pas permis d'observer des complexes tripartites. De même, les expériences menées avec les objets OprM-MSP et MexB-MSP, nanodisques minimaux sans lipides, n'ont pas permis l'observation de complexes tripartites en ME. Ces premiers résultats suggèrent que le MexA doit recourir à une insertion préalable de son ancre lipidique dans une phase lipidique entourant le transporteur MexB avant d'établir avec celui-ci des interactions protéine-protéine adéquates.

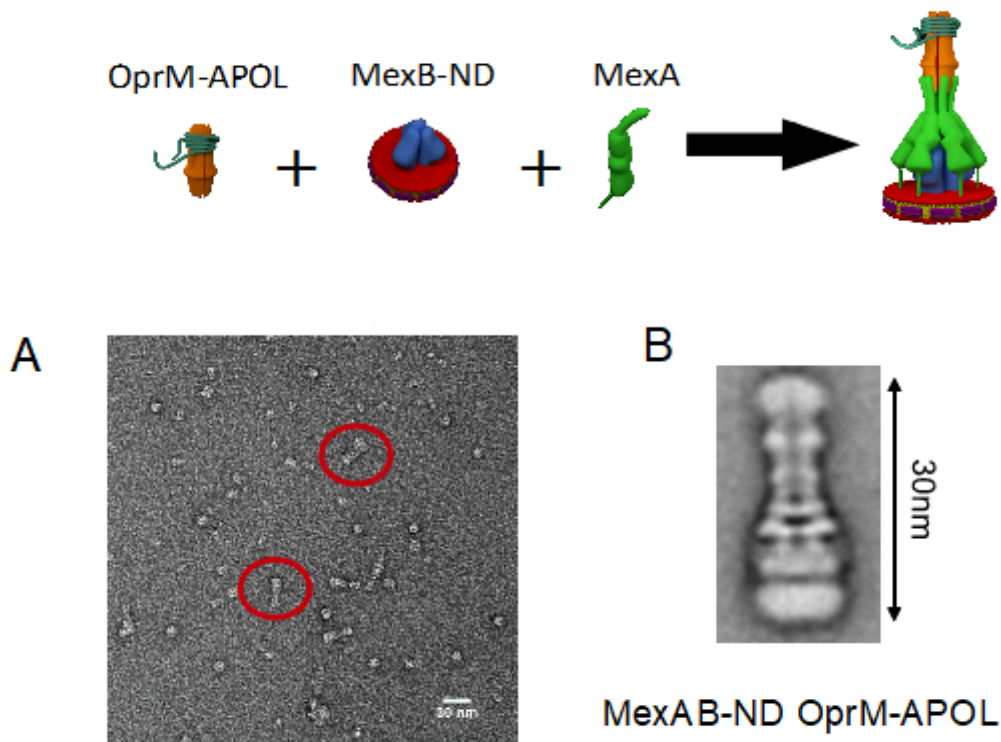


Figure 45 : OprM-APOL permet la formation d'un complexe tripartite. A- Un mélange de OprM-APOL, MexB-ND et MexA en détergent résulte en la formation de complexes tripartites (cercles rouges). B- L'image moyenne réalisée sur 380 particules de ce complexe est identique à celle du complexe MexA, MexB-ND et OprM-ND.

L'expérience complémentaire à celle décrite plus haut consiste à reconstituer la protéine MexA en Amphipol pour évaluer sa compétence à former le complexe tripartite lorsque la mobilisation de son ancre lipidique est prohibée. Malheureusement, après retrait du détergent, l'éluion sur colonne d'exclusion stérique a montré que de nombreux agrégats s'étaient formés pendant le processus de reconstitution, peu efficace (Figure 46). Ceci s'explique probablement par la taille et la nature de la partie hydrophobe à stabiliser ; simplement trois molécules d'acide palmitique branchées sur un squelette de glycérol par monomère de protéine tout au plus. Cependant, un pic d'éluion à environ 1,3 mL confirme la présence de protéine reconstituée et non agrégée, bien que la forme allongée et la faible largeur de ces objets ne

permettent pas d'en déterminer la structure par des observations par ME en coloration négative. Pour comparaison, ce volume d'élution est semblable à celui de OprM-APOL. Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces MexA aient adopté une forme dimérique en accord avec les données biochimiques présentées dans la littérature malgré que le volume d'élution plaide en faveur d'une organisation hexamérique de taille comparable à celle d'un OprM par exemple. Cependant l'observation en ME ne permet pas de conclure de manière certaine en ce sens. L'utilisation de cette population de MexA-APOL purifiée par SEC pour la réalisation d'un mélange avec les protéines OprM-APOL et MexB-APOL n'a pas abouti à la formation d'assemblages tripartites.

En conclusion, la formation de la pompe a été obtenue lorsque MexB est entouré de lipides qui semblent nécessaires à l'ancrage du MexA.

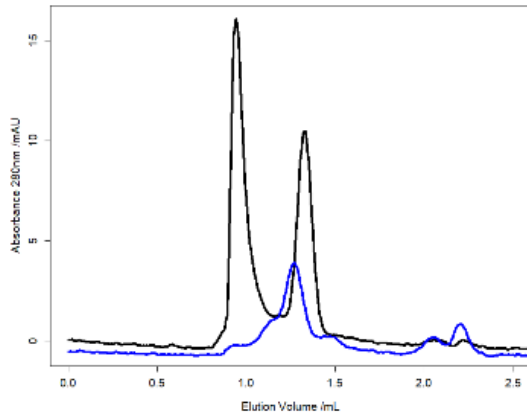
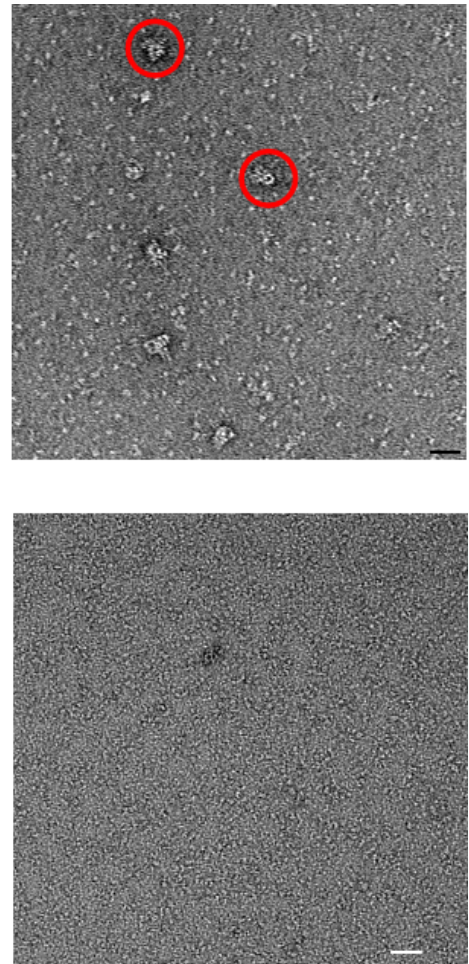
**A****B**

Figure 46 : Reconstitution de MexA en Amphipol. A- Le profil d'élution sur SEC de MexA-APOL présente un pic majoritaire d'agrégats indiquant un échec de la reconstitution. Un deuxième pic, élu à un volume similaire de celui de OprM-APOL (bleu) laisse penser que MexA a adopté une organisation hexamérique qui a des dimensions proches de celle de OprM. B-Les observations en ME en coloration négative montre essentiellement des petits objets à la structure non identifiable. Quelques objets, minoritaires, qui pourraient être des hexamères ou des agrégats sont encerclés en rouge. Barre d'échelle, 30 nm.

### B.3 Mise au point de techniques d'analyse quantitative de la formation du complexe tripartite.

Afin de quantifier les effets de différentes variables sur l'assemblage tripartite, des méthodes quantitatives de dosage des complexes formés ont été mises en œuvre. Dans un premier temps et en prolongement du chapitre précédent, j'ai tenté de mesurer l'importance des lipides pour la formation du complexe en utilisant une approche biochimique avec un système à base de billes (magnétiques ou agarose) couplées à la streptavidine pour capturer les molécules biotinylées et quantification sur gel SDS-PAGE. La logique était la suivante : les observations de ME ayant révélé la présence de complexes tripartites lorsque MexB est reconstitué en nanodisque, il serait possible de purifier ces derniers par affinité streptavidine/biotine en fixant une molécule de biotine sur l'OprM. La stratégie adoptée consistait à stabiliser OprM avec des Amphipols biotinylés (OprM BAPOL). Ces Amphipols modifiés ont été généreusement donnés par Martin Picard du laboratoire de Biologie Physico-Chimie des Protéines Membranaires (IBPC). L'éluat déposé sur un gel dénaturant SDS-PAGE permettrait ensuite de quantifier, par une méthode similaire à celle décrite dans l'article du chapitre 3, la quantité de matière correspondant à la bande de la protéine MexB, qui rend compte spécifiquement de la présence d'assemblages tripartites. Si des conditions d'incubation aboutissent à de meilleurs rendements de formation des complexes, alors la quantité de MexB mesurée sur le gel serait plus importante. Par ailleurs, la stabilisation de MexB par les Amphipols, sans lipides, aboutirait à une absence complète de MexB sur gel, puisqu'il ne permet pas de former des complexes tripartites.

Cette approche n'a pas pu être menée à son terme à cause d'une forte fixation non spécifique de toutes les protéines, en particulier MexA et MexB, prohibant une interprétation fiable et précise des résultats (Figure 47).

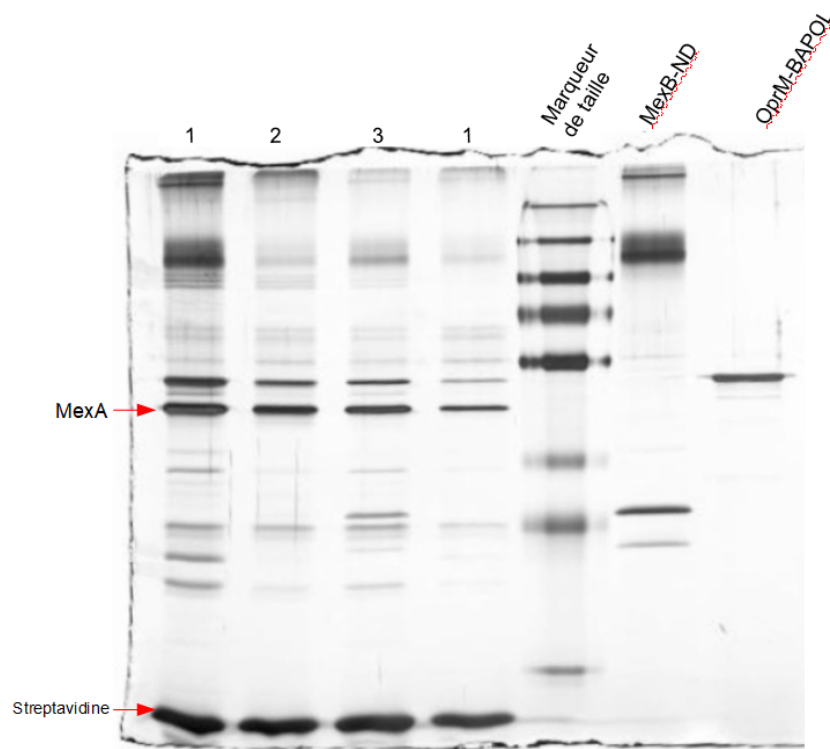


Figure 47 : Purification sur billes streptavidine de complexes MexAB-OprMBAPOL. Les éluats sont déposés sur gel 12% SDS-PAGE et révéle au nitrate d'argent. 1- Dépôt d'un mélange de MexA, MexB-BAPOL et OprM-ND, toutes les protéines se sont fixées sur les billes alors que seul MexB devrait être observé. Ce mélange ne forme pas de complexes tripartites. 2- Dépôt d'un mélange de MexA, MexB-ND, OprM-ND, aucune de ces protéines ne devraient apparaître sur le gel car non biotinylées. Ce mélange ne forme pas de complexes. 3- Dépôt d'un mélange de MexA, MexB-ND et OprM-BAPOL. Ce mélange permet de former des complexes tripartites. Résultats non interprétables du fait de la fixation non spécifique observée dans les autres cas.

Le recours à différents types de billes streptavidine, agarose ou magnétique, de fournisseurs différents, et aux propriétés de surface hydrophile ou hydrophobe, n'a pas amélioré les résultats. De nombreux essais d'incubation et de lavage des billes par des Tampons contenant des détergents (Triton, Tween 20, DDM) à des concentrations faibles n'ont pas réussi à prévenir la fixation non spécifique des protéines, ou bien, dans le cas du SDS ou de concentrations élevées, ont complètement aboli la fixation des protéines. Cette fixation non spécifique et difficilement maîtrisable est probablement le fait de dénaturation ou d'agrégation des protéines en surface des billes. Celle-ci est certainement favorisée par la présence de détergent dans le mélange MexAB-OprM nécessaire à la solubilisation du MexA, qui peut fragiliser les protéines ou les complexes protéines-APOL et protéines-ND. Les complexes tels qu'ils sont formés par la méthode 1 se trouvent vraisemblablement dans un état métastable aisément perturbé par la modification des conditions chimiques de la solution qui les entoure.

Face à cette difficulté, j'ai utilisé une stratégie qui réduit la manipulation des mélanges de formation des complexes tripartites, une approche permettant la caractérisation des biomolécules directement dans leur environnement a été adoptée : la thermophorèse. Cette technique consiste à suivre la variation de fluorescence résultant du mouvement des macro molécules marquées dans un capillaire soumis à un gradient de température par illumination d'un laser (Figure 48). Les protéines sont mues à des vitesses différentes en fonction de leur rayon hydrodynamique, de leur charge et de leur état de solvation (Seidel 2013). Dans notre cas, un complexe tripartite, en forme de bâtonnet de 30 nm de long, aura un signal de thermophorèse bien différent des protéines MexB et OprM permettant son identification sans ambiguïté. Les mesures de thermophorèse ont été effectuées dans le laboratoire d'Alain Roussel, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB) de Marseille.

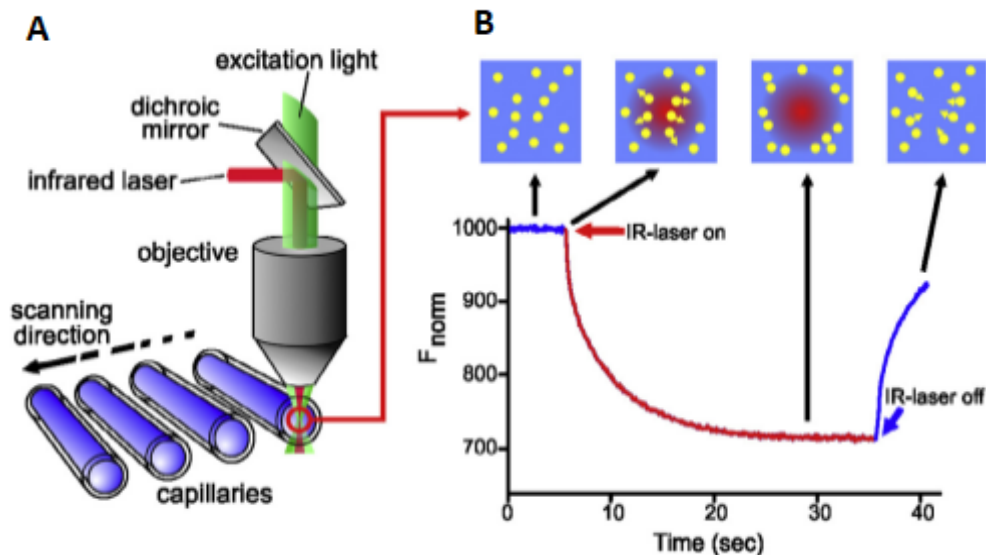


Figure 48 : Principe de la thermophorèse (Willemsen 2014). A- Les mesures sont effectuées sur des solutions contenues dans des capillaires. Ceux-ci sont chauffés par un laser infrarouge ce qui entraîne la formation d'un gradient de température dans le capillaire. B- Le différentiel de température provoque la fuite des molécules hors de la zone chauffée par le capillaire et une décroissance de fluorescence des objets marqués est mesurée au cours du temps. Moins les complexes sont mobiles, plus la fluorescence demeure élevée, ce qui permet de repérer le complexe tripartite.

J'ai donc procédé au marquage des protéines MSP1D1 qui ceinturent les nanodisques de OprM par un fluorophore, l'Alexa 647. La conjugaison entre le fluorophore et la protéine se fait principalement au niveau de l'amine terminal, dans les conditions de pH neutre utilisées pour l'expérience. L'efficacité de marquage de la MSP est estimée à 0,7 ce qui signifie qu'en moyenne 70% des MSP sont marquées au moins une fois par le fluorophore. La reconstitution de nanodisques OprM avec les MSP marquées a été réalisée comme décrit au chapitre 2 puis le mélange de reconstitution a été purifié par SEC. Les mélanges MexA, MexB-ND et OprM-ND<sub>Alexa647</sub> sont réalisés selon la méthode 1 pour une gamme de concentrations en MexA contenues entre 0 et 240  $\mu\text{M}$  (Figure 49). Une fois les mélanges incubés pendant une semaine, les mesures de Thermophorèse sont réalisées.



Celles-ci montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence à mesure que la concentration en MexA augmente ce qui est le résultat attendu. Cependant, la courbe prend la forme d'une hyperbole et non d'une sigmoïde. Ceci vient d'un sous échantillonnage des faibles concentrations en MexA, le plateau est atteint trop rapidement et ne permet pas l'observation d'une transition entre un déficit et un excès de MexA. Ces résultats ont été obtenus récemment et sont encourageants. Par manque de temps et considérant les quantités importantes de protéines qui sont consommées pour la préparation d'échantillons mesurables par Thermophorèse, il est nécessaire de posséder une production de complexes en plus grande quantité, expériences que je n'ai pas eu le temps de réaliser. Cependant ces premiers résultats obtenus avec la thermophorès montrent que cette méthode semble en mesure de quantifier la formation des complexes tripartites.

En conclusion, la quantification biochimique s'est avérée impossible à cause d'une grande propension des protéines du mélange MexAB-OprM à produire un signal non spécifique. Cependant, le suivi de la formation des complexes par thermophorèse est envisageable mais demande encore de la mise au point notamment concernant la gamme de concentrations en MexA à utiliser. Cette technique pourrait être utile pour un criblage précis et simple de molécules inhibitrices de la formation de la pompe.

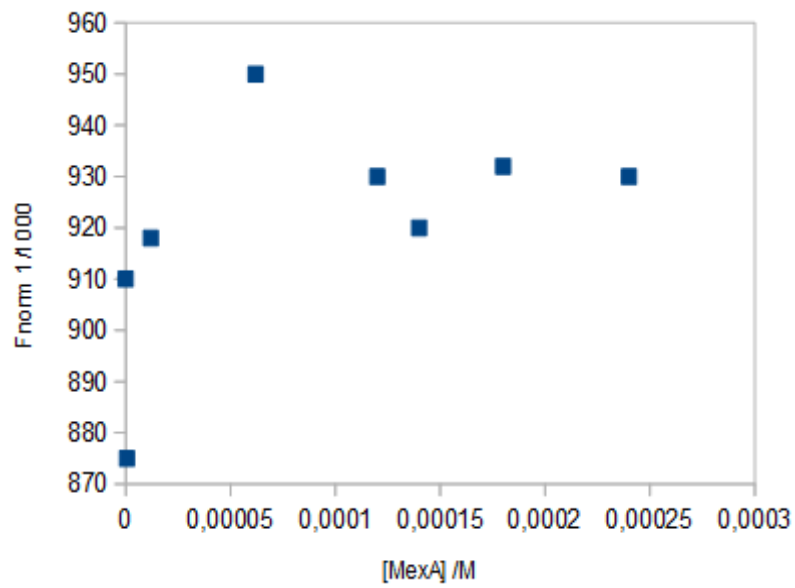


Figure 49 : Mesure d'un mélange MexA, MexB-ND et OprM-ND<sub>Alexa647</sub> par thermophorèse. L'intensité de fluorescence normalisée croît à mesure qu'augmente la concentration en MexA, comprise entre 0 et 240 $\mu$ M. Ceci indique que plus de complexe est formé aux fortes concentrations en MexA, le complexe étant moins mobile que les OprM-ND<sub>Alexa647</sub> individuels, la perte de fluorescence est moins importante. Cependant la gamme n'a pas assez de points pour les faibles concentrations en MexA.





## Chapitre 5 :

### Détermination de la structure du complexe MexAB-OprM en nanodisques par cryo-ME

La réalisation de mélanges MexAB-OprM selon la méthode séquentielle décrite au chapitre 2 a permis, après purification des complexes tripartites par SEC, la préparation de grilles de ME qui ont fait l'objet d'observations en cryo-ME par la doctorante Marie Glavier. Son travail d'analyse d'images a permis, récemment, de reconstruire un modèle 3D de la pompe à efflux avec une résolution globale de 3,5 Å en symétrie C1 (Figure 50). La pompe est composée d'un trimère d'OprM, d'un hexamère de MexA et d'un trimère de MexB, aboutissant à une stœchiométrie 3:6:3. La protéine canal OprM est maintenue en conformation ouverte par l'interaction avec son partenaire MexA, lui-même organisé en hexamère. Enfin MexA vient au contact de MexB au moyen de ses domaines tonneau et Membrane Proximal. OprM présentant deux faisceaux d'hélices périplasmiques par monomère, H3H4 et H7H8, issus d'une duplication interne de sa séquence, la protéine canal peut donc interagir avec deux molécules de MexA qui interagissent elles-mêmes par leur extrémité opposée en se positionnant soit sur un monomère de MexB (MexA-Intra) soit entre deux monomères de MexB (MexA-inter).

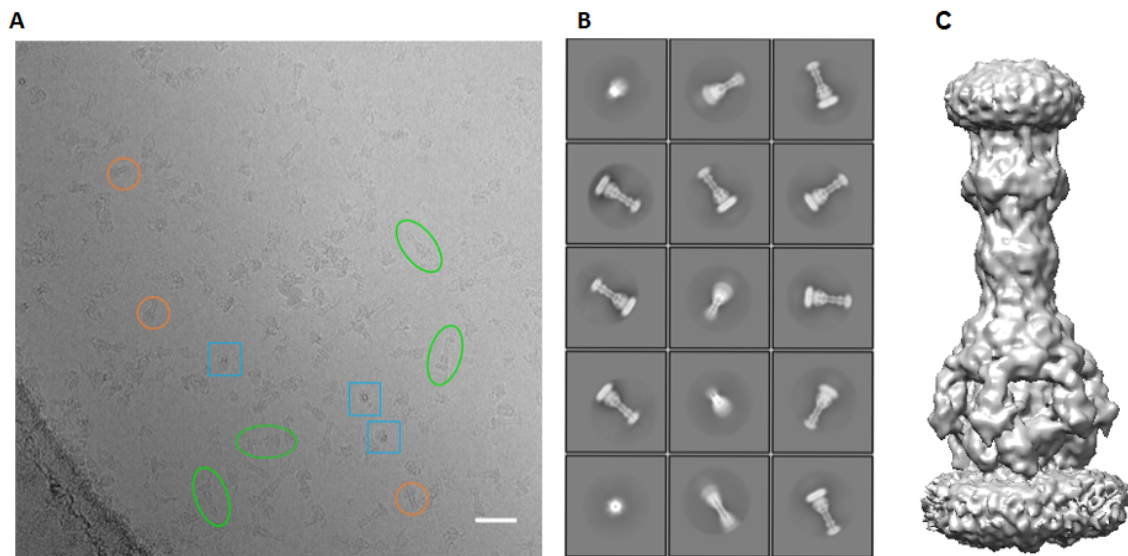


Figure 50 : Observation des pompes à efflux MexAB-OprM par cryo-ME. A- Champs d'observation des complexes tripartites purifiés sur un Titan Krios qui présente une répartition homogène des particules avec des orientations variables : vue de côté (vert), vue de dessus (bleu) et intermédiaire (orange). B- Ensemble des classes 2D obtenues par classification de 96 755 particules dans lesquelles sont représentées chacune des orientations précédemment décrites. C- Carte de densité 3D de la pompe MexAB-OprM. Barre d'échelle 30 nm.

Une classification plus précise des objets a révélé l'existence de deux classes 3D principales, nommée Assemblage 1 et Assemblage 2, de résolutions respectives 3,80 Å et 3,74 Å en symétrie C1, correspondant à deux populations d'égales proportions de complexes qui ne diffèrent que par la position de OprM au sein de la structure du complexe tripartite (Figure 51). En effet, l'OprM d'un premier Assemblage exhibe une rotation de 60° par rapport à l'OprM du deuxième Assemblage. Il fut possible de repérer cette subtile différence structurale grâce à la résolution des chaînes peptidiques en N-terminal des monomères de OprM qui présentent une acylation post-traductionnelle qui se rabat vers la phase lipidique du nanodisque. Avant un affinement de la classification des objets, la carte de densité finale arborait six extrémités N-terminales à 60° d'écart les unes par rapport aux autres, ce qui est

impossible de part la structure du trimère de OprM et démontre un mélange de positionnements de l'OprM dans la carte de densité initiale. Le faisceau d'hélices H7H8 d'un monomère de OprM peut donc faire face à la jonction entre deux monomères adjacents de MexB ou bien au sous-domaine PC2/PN1 d'un monomère de MexB.

La possibilité de faire alterner la position de OprM dans le complexe tripartite indique que la constitution de ces assemblages procède par interactions concomitantes entre chacun des partenaires et en particulier, OprM n'exerce pas de préférence vis-à-vis de MexA-intra plutôt que MexA-inter.

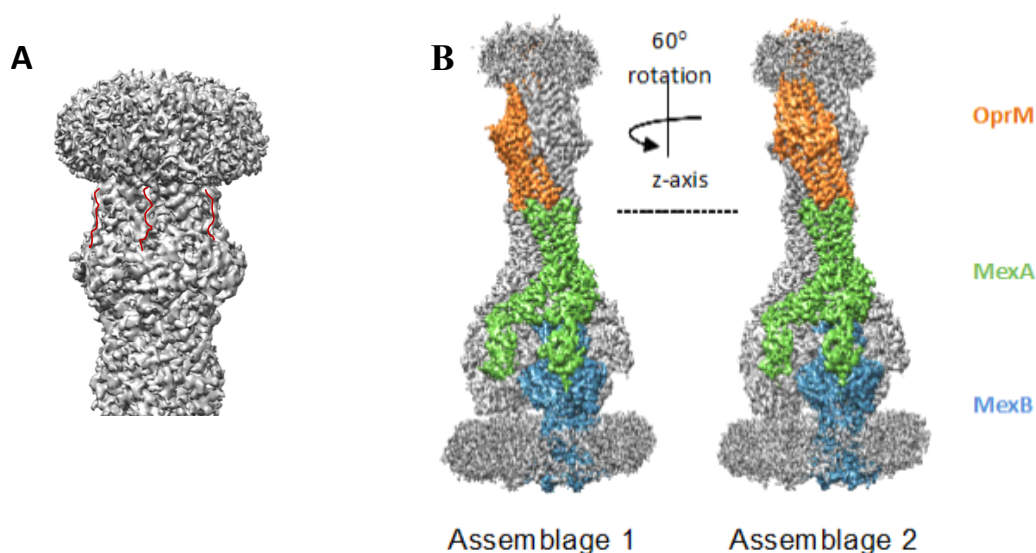


Figure 51 : Carte de densité de la pompe à efflux MexAB-OprM. A- La carte de densité initiale figure six extrémités N-terminales par trimère d'OprM (segments rouges) ce qui implique une superposition de deux conformations distinctes de OprM avec une rotation de 60°. B- L'analyse d'images révèle l'existence de deux populations d'assemblages différant par une rotation de 60° de OprM par rapport à MexAB.

Par la suite, l'imposition d'une symétrie C3 a permis la reconstruction d'une carte de densité à 3,3 Å pour chacun des deux modèles. L'asymétrie du transporteur MexB est perdue lors de ce processus, mais il permet d'affiner la résolution des contacts OprM-MexA. A partir de cette carte de densité, Isabelle Broutin de l'Université Paris Descartes a pu procéder à la construction d'un modèle atomique en utilisant les structures cristallographiques connues pour chacune de ces protéines (Figure 52). Ce modèle atomique permet de définir les points de contacts entre OprM et MexA qui stabilisent la conformation de la première et aide à la formation de l'hexamère pour la seconde.

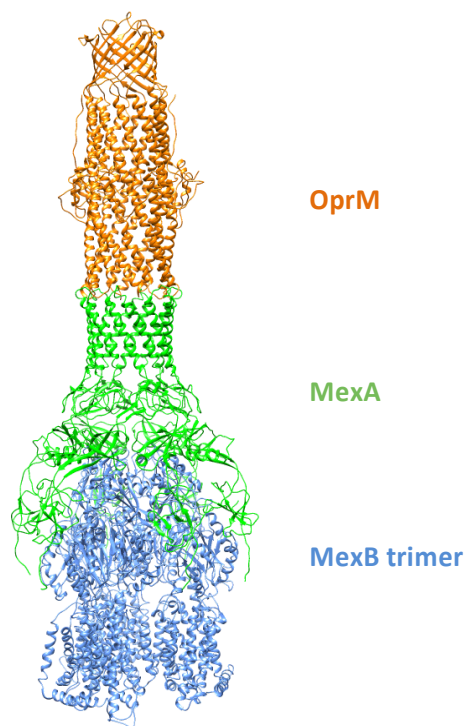


Figure 52 : Modèle atomique de l'Assemblage 1 de la pompe MexAB-OprM. Un trimère de OprM en conformation ouverte interagit par les extrémités de ses tiges-boucles avec celles d'un hexamère de MexA. Trois monomères de MexA sont liés aux sous-domaines DC et PC2 du transporteur MexB, ce sont les MexA-Intra. Les autres monomères de MexA sont liés aux sous-domaines DN et PN2 de MexB, ce sont les MexA-Inter.



Les hélices H7 et H8 d'un monomère d'OprM font 3 contacts avec un monomère de MexA via les résidus G199-Q109, V206-S107 et A203-Q104 respectivement tandis que les hélices H3 et H4 de ce même monomère de OprM forment 3 contacts avec un deuxième monomère de MexA via les résidus G407-Q109, V408-S107 et Y411-Q104 respectivement (Figure 53). Ces deux monomères non équivalents de MexA sont différenciables par leur position au niveau de la protéine MexB, le premier qualifié de MexA-intra se situe à proximité des sous-domaines PC2-PN1 de MexB tandis que le deuxième nommé MexA-inter se situe à proximité des sous-domaines PC1-PN2 à la jonction entre deux protomères de MexB.

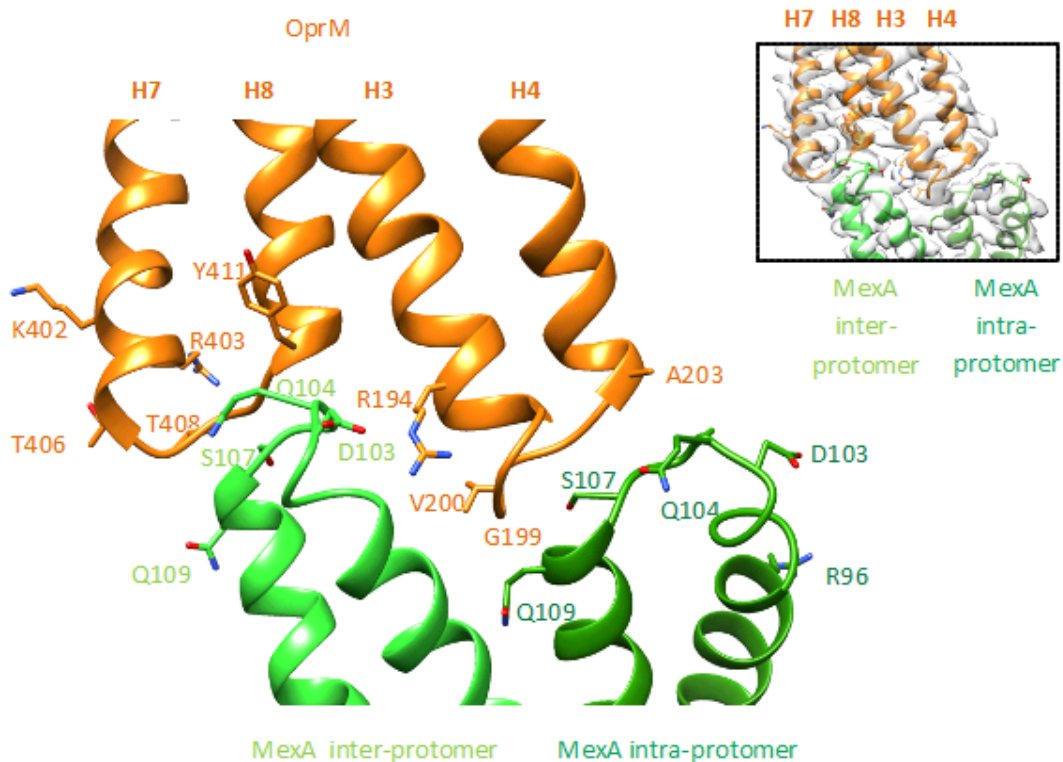


Figure 53 : Contacts MexA-OprM au sein du complexe tripartite. Chaque monomère de OprM est en contact avec deux monomères de MexA non équivalents. MexA-Inter s'intercale entre les faisceaux d'hélices H7H8 et H3H4 d'un même monomère de OprM tandis que MexA-Intra se positionne à la jonction des faisceaux d'hélices H4H4 et H7H8 du monomère d'OprM adjacent. Les contacts entre MexA et OprM se font par le biais de liaisons Hydrogène.

Par ailleurs, la superposition des structures de ces deux MexA révèle des différences structurales importantes entre les domaines Membrane Proximal et tonneau  $\beta$  pour accommoder chaque position, intra et inter, autour du transporteur MexB (Figure 54). En revanche, les domaines lipoyl et tige boucle d'hélice sont identiques car ils participent tout deux à l'hexamérisation de la protéine MexA.

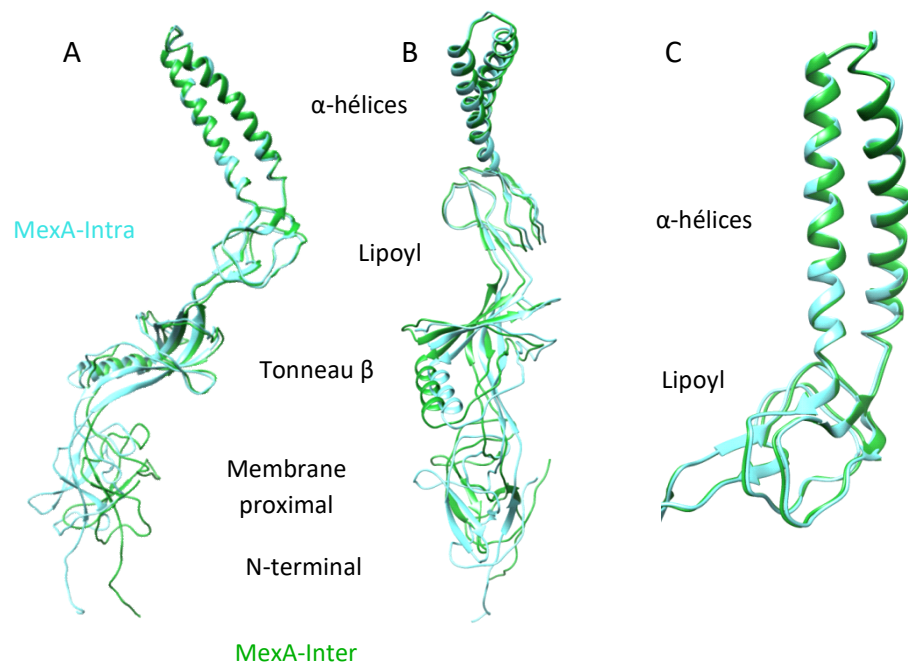


Figure 54 : Alignement des MexA-Intra et MexA-inter montre des différences entre la position des domaines Membrane Proximal et tonneau  $\beta$ . A et B- LA superposition des structures alignées de MexA-Intra (bleu) et MexA-inter (vert) révèle une différence de positionnement du domaine Membrane Proximal en particulier qui permet d'accueillir les sites de liaisons spécifiques de chaque MexA sur le transporteur. C- Les domaines lipoyl et tige boucle sont quant à eux identiques.

MexA interagit donc avec son transporteur MexB au moyen de ses domaines Tonneau  $\beta$  et Membrane Proximal. MexA-inter positionne son domaine tonneau  $\beta$  au niveau de la boucle du domaine DN de MexB et forme deux contacts par les paires de résidus R34-P255 et G232-K252 respectivement. Le domaine Membrane Proximal de MexA-inter établit des contacts

avec le sous-domaine PN2 de MexB grâce aux résidus Q330-Q319, K280-Y182 et D278-R764 respectivement (Figure 55).

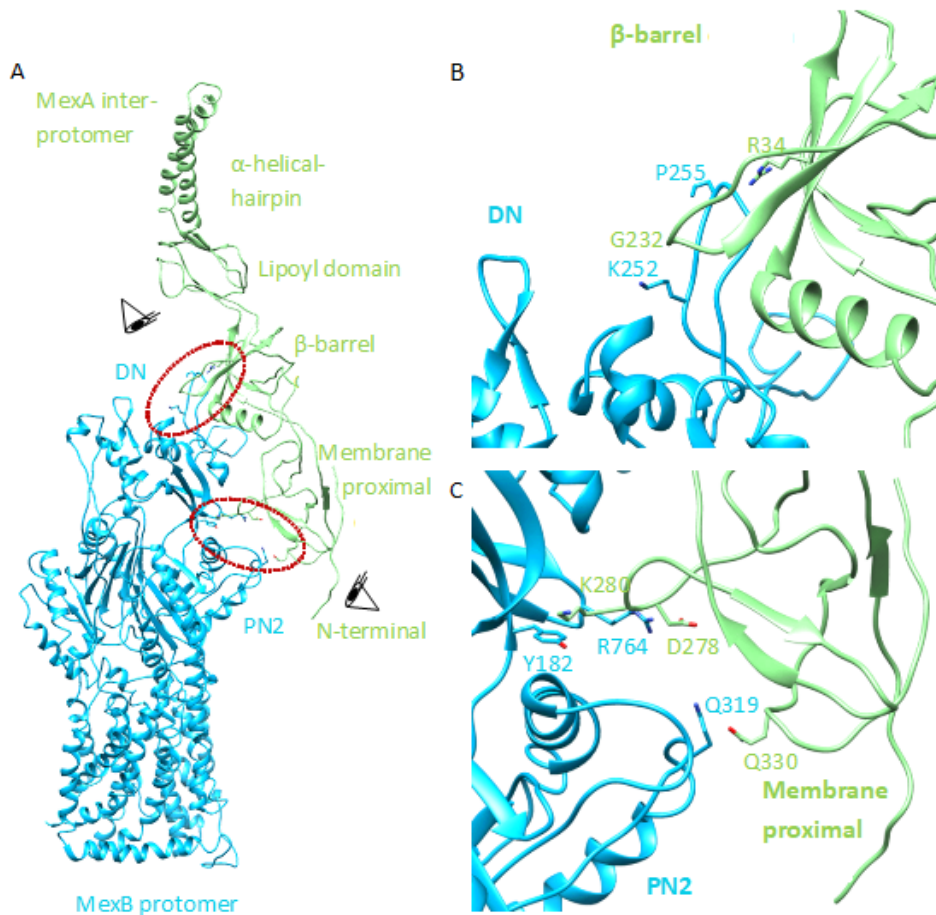


Figure 55 : Contacts entre MexA-inter et MexB. A- Vue d'ensemble, MexA-inter vient au contact des sous-domaines PN2 et DN de MexB par ses domaines tonneau  $\beta$  et Membrane Proximal. B- Grossissement du contact entre le domaine tonneau  $\beta$  de MexA-inter et MexB. Seulement deux résidus de chaque protéine sont impliqués. C- Grossissement du contact entre MexB et le domaine Membrane Proximal de MexA, qui implique 3 résidus pour MexB et 2 pour MexA.

MexA-intra interagit de manière similaire avec la boucle du sous-domaine DC de MexB par les résidus R34-S195, T182-N801, G232-N792, T233-E796 et F254-S195 respectivement (Figure 56). Quant au domaine Membrane Proximal il se fixe au sous- domaine PC2 via les

résidus E14-K659, G325-K659 et Q327-A661 respectivement. Enfin, MexA-intra forme des contacts avec la longue boucle du sous-domaine DN d'un protomère MexB adjacent par ses résidus Q272-Q229, Q273-Q229 et Q307-Q229 respectivement. Le MexA-intra possède plus de points de contacts vis-à-vis du protomère de MexB sur lequel il est positionné ce qui laisse penser que son affinité pour le transporteur pourrait être supérieure à celle de MexA-inter.

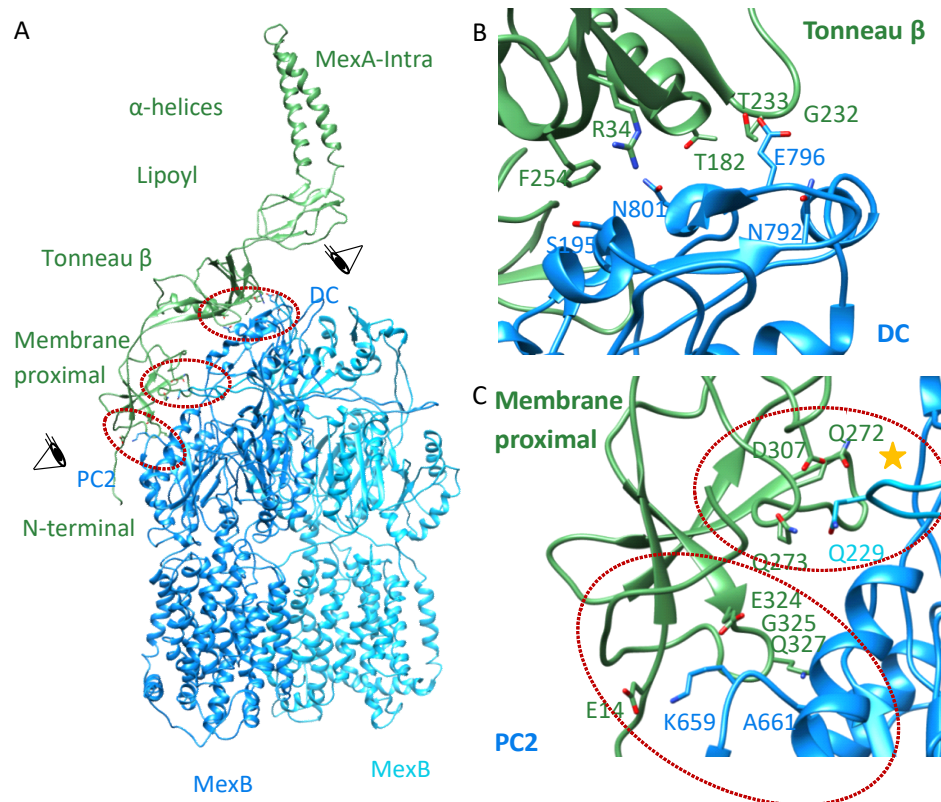


Figure 56 : Contacts entre MexA-intra et MexB. A- Vue d'ensemble, MexA-intra vient au contact des sous-domaines PC2 et DC de MexB par ses domaines tonneau  $\beta$  et Membrane Proximal. B- Grossissement du contact entre le domaine tonneau  $\beta$  de MexA-intra et MexB. C- Grossissement du contact entre MexB et le domaine Membrane Proximal de MexA, qui implique deux sites de liaison différents (encadrés en rouge).

Enfin, à l'instar de OprM, il est possible d'identifier les segments peptidiques en N-terminal de chaque MexA qui descendent vers le nanodisque pour permettre à l'ancre lipidique de s'y insérer. Ceux-ci sont déstructurés et semblent ici revêtir un rôle de bras espaceur permettant aux MexA de s'éloigner de la membrane pour atteindre leurs surfaces d'interaction sur MexB, situées à environ 2 nm de la bicouche.

Afin de vérifier l'état conformationnel de MexB, dont les structures cristallines révèlent qu'il est asymétrique, un alignement des particules ne se concentrant que sur la partie MexB-ND du complexe a été effectué (Figure 57). Cet alignement a permis de générer trois classes 3D de particules, chacune de ces trois classes étant identique aux autres par mouvement de rotation de 0°, 120° ou 240°. Dans notre complexe MexB adopte donc une conformation asymétrique ATE exclusive.

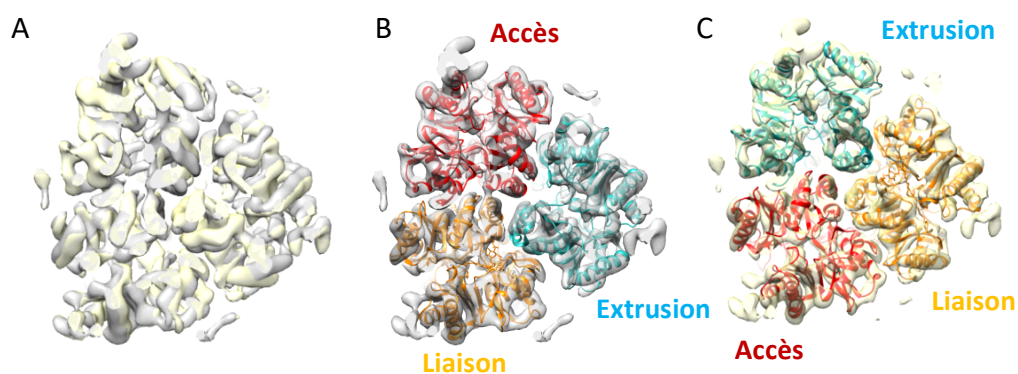


Figure 57 : MexB adopte une conformation trimérique asymétrique au sein du complexe tripartite. La classification des objets se focalisant uniquement sur la protéine MexB génère trois classes dont les densités correspondent à la structure asymétrique cristalline de MexB (2V50) et diffèrent par des rotations de 120°.

En conclusion de ce chapitre, la structure de la pompe déterminée par cryo-ME montre qu'il existe deux assemblages possibles. Ces deux assemblages sont construits selon le même schéma : un trimère d'OprM est en interaction bout-à-bout avec six molécules de MexA et adopte une conformation ouverte au niveau de son extrémité périplasmique au contraire de sa structure cristalline. Cela signifie que les interactions MexA-OprM induisent un changement de conformation d'OprM conduisant à l'écartement des extrémités de ses boucles périplasmiques.

Les six molécules de MexA sont ancrées dans la membrane lipidique et interagissent via les domaines tonneaux et Membrane Proximal avec MexB. La structure hexamérique de MexA des domaines lipoyl et tige boucle forment un canal clos entre OprM et MexB qui est ouvert vers la face extracellulaire. La conformation asymétrique de MexB ayant été décelée que très récemment, le calcul d'une structure tripartite avec MexB asymétrique est en cours.







## **Chapitre 6 :**

### **Considérations Générales**

Ce chapitre, théorique, a pour objectif de présenter les ordres de grandeurs attendus qui régissent différents aspects de la formation du complexe tripartite et qui permettent d'orienter les réflexions concernant les nombreuses hypothèses invoquées pour faire sens de l'ensemble des données expérimentales encore partiellement irréconciliables à ce jour. En particulier, et ce fut la motivation principale à la rédaction de ce texte, j'ai tenté de répondre à cette idée qui revient régulièrement dans les articles scientifiques comme dans les discussions informelles selon laquelle les deux modèles d'assemblage de pompe sont complémentaires, en équilibre dynamique, l'un étant l'intermédiaire de l'autre. J'ai par la suite digressé sur des remarques plus générales concernant les deux modèles d'assemblages, essayant de réconcilier les différentes données expérimentales qui existent.

#### A) Énergétique de l'interconversion entre un modèle court et un modèle long.

La différence majeure entre l'assemblage observé *in vitro* et celui qui a été modélisé à partir de données obtenues *in vivo* vient de la taille du complexe dans le périplasme. Une variation de l'ordre de 6 nm est attendue et celle-ci requiert, si un assemblage est l'intermédiaire de l'autre, que soit développée une énergie suffisante pour dilater ou comprimer le périplasme localement sur 6 nm (Figure 58).

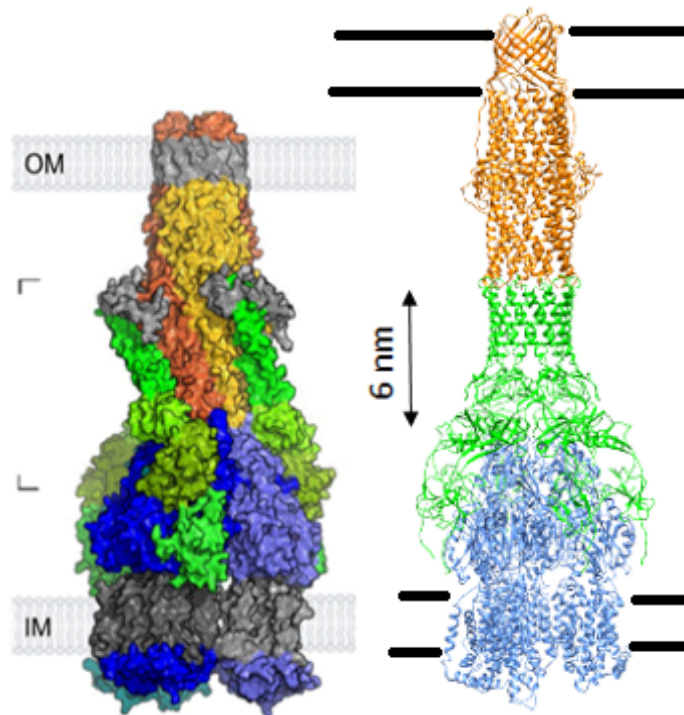


Figure 58 : Comparaison des modèles long et court du complexe tripartite. A gauche le modèle court de AcrAB-TolC (Symmons 2009) et à droite le modèle atomique présenté plus haut pour MexAB-OprM. L'absence de contact direct OMF-transporteur implique que le passage d'un modèle à l'autre requiert une variation de 6 nm de la hauteur périplasmique.

Il est possible d'estimer cette énergie. Connaissant la surface moyenne de la membrane interne d'une bactérie comme *E.coli*, environ  $4 \mu\text{m}^2$  (Prats 1989), et la pression de turgescence qui existe au sein de son périplasme, variant de 0,5 bar à 3 bar pour une osmolarité du milieu extracellulaire comprise entre 500 mOsm et 30 mOsm (Cayley 2000), il est possible de calculer l'énergie nécessaire à une dilatation du périplasme de 1 nm par l'équation suivante :

$$W_{\text{dilatation}} = \text{Force} \times \text{déplacement}$$

$$W_{\text{dilatation}} = \text{Pression} \times \text{Aire} \times \text{déplacement}$$

$$W_{\text{dilatation}} = 0.5 \cdot 10^5 \times 4 \cdot 10^{-12} \times 1 \cdot 10^{-9} = 2 \times 10^{-16} \text{ J}$$

$$W_{\text{dilatation}} = 2 \cdot 10^{-16} \times 6 \cdot 10^{23} = 1 \times 10^8 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$W_{\text{dilatation}} = 100 \text{ MJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Dans le cas d'une pression de 3 bar, le même calcul aboutit à une énergie de 600 MJ/mol. Cela signifie que les protéines du complexe tripartite, mais essentiellement la PAP, MexA, puisque c'est elle qui a la possibilité de faire varier sa conformation, doivent fournir par leur interaction une énergie comprise dans un intervalle entre 0,6 et 1,2 GJ/mol, pour effectuer la transition d'un modèle de pompe court à un modèle de pompe long. Cette énergie est cependant calculée pour une variation d'épaisseur du périplasme sur la totalité de la circonférence de la bactérie. Pour obtenir des valeurs plus favorables à l'hypothèse d'une interconversion dynamique, il est possible d'effectuer les mêmes calculs en supposant que seule une région locale subit une variation d'épaisseur périplasmique. Si cette région est réduite au plus étroit possible, c'est-à-dire à la largeur de MexB, soit un disque de 15 nm de diamètre, alors les valeurs suivantes sont obtenues pour une variation d'épaisseur périplasmique de 6 nm :

Pression de 0,5 bar	Pression de 3 bar
12 kJ/mol	60 kJ/mol

A titre de comparaison, pour une pression faible, l'énergie nécessaire est de l'ordre de celle contenue dans le gradient protons tandis qu'à forte pression, l'énergie nécessaire est proche de celle de l'hydrolyse d'ATP en conditions physiologiques. Les énergies mises en jeu dans ce scénario sont plus réalistes et n'interdisent pas strictement un mouvement tel que celui

qui est supposé gardant à l'esprit que jusqu'à six monomères de MexA peuvent être impliqués dans la dilatation périplasmique envisagée, réduisant d'autant l'énergie à fournir par protéine.

Cependant, il existe déjà des machineries cellulaires qui ont pour mission de transpercer l'enveloppe des bactéries, à savoir les aiguilles contractiles des phages et des systèmes de sécrétion de type VI (T6SS). Les mesures de calorimétrie ont montré que la contraction de la queue du bactériophage T4 permet de libérer une énergie de 25 MJ/mol (Arisaka, 1981) tandis qu'une estimation de la force contractile développée par le T6SS avoisine les 75MJ/mol (Basler 2015). Pourtant, le diamètre d'interaction entre ces machineries protéiques et la membrane externe des bactéries est d'environ 10 nm. La différence importante entre les énergies calculées plus haut pour une dilatation locale du périplasme et celles mises en jeu par les aiguilles contractiles, nous enseigne vraisemblablement que la rigidité des membranes et la présence d'un cytosquelette interdisent l'existence de patch membranaires locaux indépendants. Il semble donc que les énergies monumentales estimées au début de ce chapitre correspondent à l'ordre de grandeur correct, et de ce fait, rendent peu plausibles l'hypothèse d'une interconversion dynamique entre les deux modèles.

## B) Possibilité d'une interconversion sans variations d'épaisseur du périplasme

Si la distance périplasmique est telle que le contact direct entre OMF et transporteur RND est proscrit, alors il demeure possible que la PAP MexA subisse un changement conformationnel après une première étape de fixation à son transporteur qui déclencherait une transition d'un état où le domaine Membrane Proximal est proche de la membrane interne vers un état qui est celui observé dans notre structure, où le domaine Membrane Proximal se situe

à environ 2 nm au-dessus de la membrane interne (Figure 59).

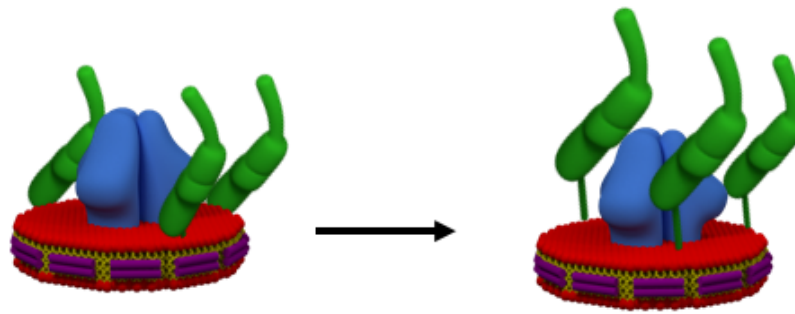


Figure 59 : Schéma présentant l'effet de l'interaction MexAB sur MexA. Dans un premier temps MexA possède un domaine Membrane Proximal replié et se trouve au contact de la membrane interne. Dans un deuxième temps, l'interaction avec MexB entraîne un dépliement du N-terminal de MexA qui lui permet de se décoller de 2 nm de la membrane pour interagir avec OprM.

Il est intéressant de noter que dans notre structure, la visualisation des N-terminaux de MexA permet de conclure sans ambiguïté quant à leur état non replié. Le concept de protéines intrinsèquement désordonnées (IDP, Intrinsically Disordered Protein), qui stipule que tout ou partie d'une protéine peut présenter une conformation qui varie d'un état replié vers un état désordonné ou inversement en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent, et modifier ainsi sa fonction ou sa capacité de liaison à des partenaires, s'applique partiellement à MexA et aux PAP en général (Uversky 2011, Schad 2011).

En effet, des algorithmes de prédiction (PONDR, Predictors of Natural Disordered Regions) indiquent la présence de région désordonnées, susceptibles de subir des modifications de conformation en fonction des circonstances qui affectent MexA (Figure 60). Notamment, les algorithmes identifient comme particulièrement désordonnées les régions contenant les 30 derniers acides aminés des extrémités C-terminale et N-terminale de MexA. Cette région est en effet dépliée dans la structure de la pompe que nous avons obtenue et présente chez des

PAP homologues, par exemple CusB, qui lorsqu'elle forme un bipartite avec son transporteur, arbore une variation structurale importante dans cette même région, évocateur d'un repliement circonstanciel (Figure 61). Suivant cette logique, MexA pourrait en premier lieu adopter une position proche de celle décrite dans le modèle court de Symmons (2009), puis à la faveur d'un réarrangement conformationnel impliquant le déploiement de son N-terminal, basculer vers une position conforme à celle observée dans notre structure. Dans ce cas, la distance périplasmique n'est pas affectée et MexA joue pleinement son rôle d'adaptateur.

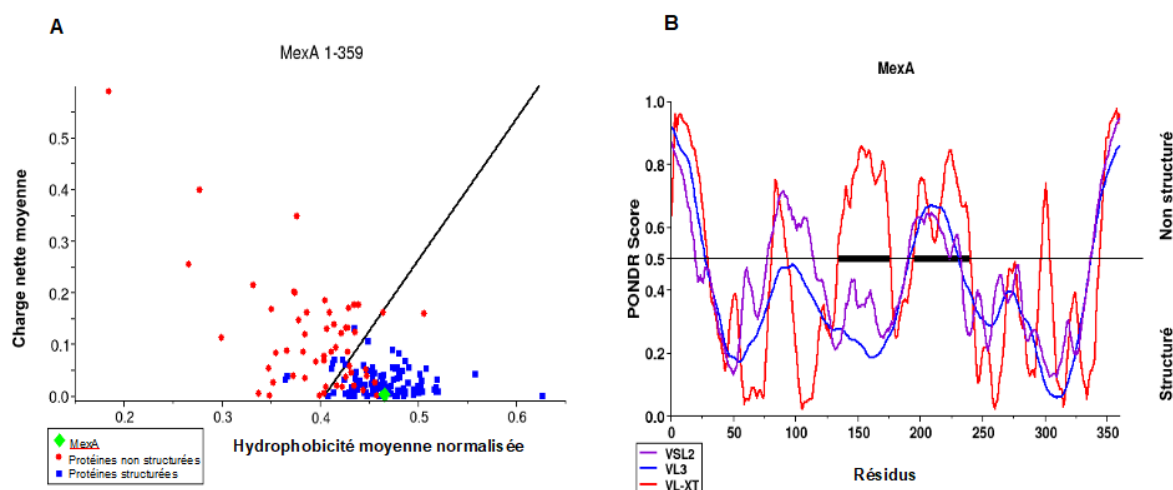


Figure 60 : MexA présente des segments de séquence caractéristiques de protéines non structurées. A- La séquence mature totale de MexA ne la place pas dans le domaine de protéines non structurées (rouge) sans pour autant exclure qu'elle en ait les propriétés. B- Différents algorithmes de prédiction de structures indiquent qu'environ 30 acides aminés en C-terminal et N-terminal de MexA sont parfaitement désordonnés. Quelques autres segments de la protéine sont aussi identifiés comme relativement peu structurés. Résultats générés par PONDR.

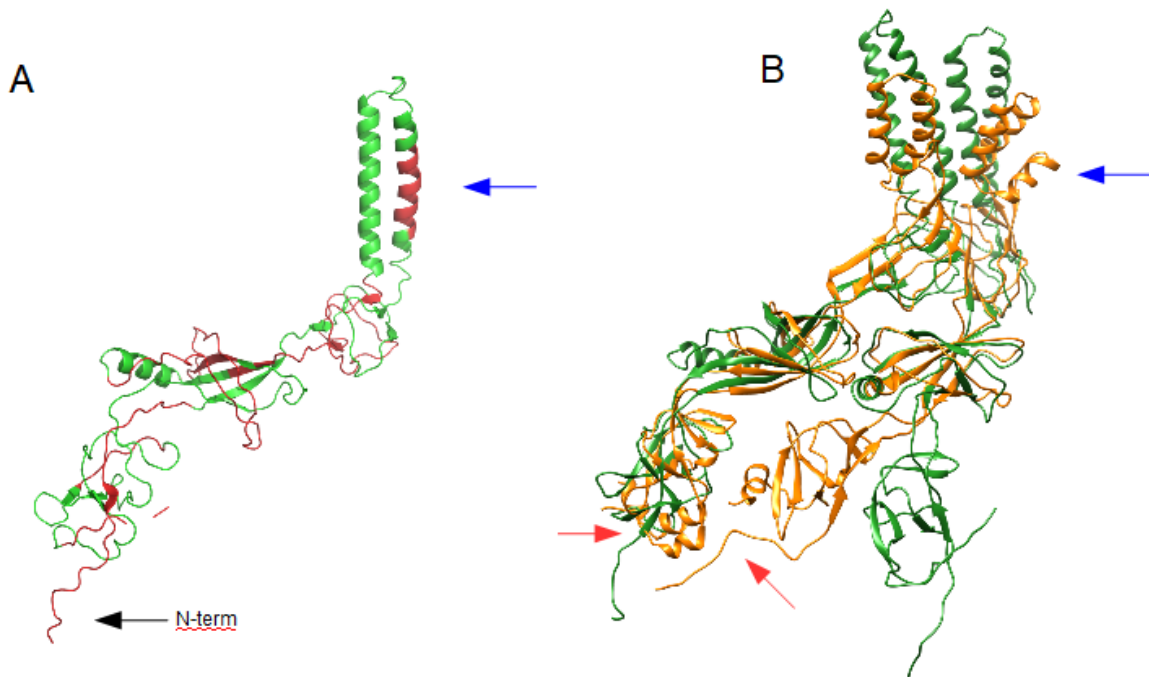


Figure 61 : MexA présente des domaines structuraux désordonnés. A- Structure de MexA-intra, les zones rouges symbolisent les régions peptidiques que les algorithmes ont identifiées comme désordonnées. Les segments N-terminal et C-terminal du domaine Membrane Proximal sont concernés et présentent en effet une absence de structuration. B- Alignement de séquence entre MexB provenant de la structure de la pompe MexAB-OprM et son homologue CusA cristallisé dans le complexe CusAB (3T51) illustrant à la fois la flexibilité de leur PAP et leur caractère désordonné. MexA-intra s'aligne correctement mais MexA-inter présente une inflexion importante de son domaine Membrane Proximal comparé à son homologue CusB. De plus, l'un des monomères de CusB présente un N-terminal complètement déplié à l'instar de MexA, tandis que l'autre monomère possède une structuration claire à cet endroit (flèches rouges). Curieusement, la structuration particulière des hélices de CusB provient d'une zone déstructurée du segment d'hélice en N-terminal, au niveau de la zone repérée par l'algorithme en A (flèches bleues), et suggère une éventuelle fragilité de MexA.

### C) Stœchiométrie de l'assemblage : implications.

La mesure du nombre de copies de MexA, MexB et OprM *in vivo*, présente un ratio molaire de 6 MexA pour 1 trimère de MexB et d'OprM (Narita 2003). Pour une surface membranaire de 4  $\mu\text{m}^2$ , ces chiffres impliquent la présence de 500 MexA/ $\mu\text{m}^2$  et 80 MexB/ $\mu\text{m}^2$ . Ceci permet de déterminer la distance moyenne qui sépare deux trimères de MexB, environ 120 nm, et deux monomères de MexA, environ 50 nm.

$$d_{\text{MexA-MexA}} = \sqrt{\frac{\text{Aire par MexA}}{\pi}}$$
$$d_{\text{MexA-MexA}} = \sqrt{\frac{1/500}{\pi}}$$
$$d_{\text{MexA-MexA}} \simeq 50 \text{ nm}$$

Dans cette configuration, un trimère de MexB est entouré en moyenne par 4 monomères de MexA. Bien que la diffusion des protéines de MexA soit importante, (Reffay 2009), une telle stœchiométrie garantit de manière certaine la présence de suffisamment de monomères de MexA à l'état stationnaire autour de MexB pour former un complexe bipartite MexAB équivalent à celui décrit par Symmons (2009). Il est possible qu'une fois ce bipartite formé, les MexA manquants viennent à son contact par simple diffusion et déclenchent le réarrangement conformationnel de la PAP. Au demeurant, la stœchiométrie telle que mesurée *in vivo* peut être fortuite. En effet, la structure même de l'opéron codant pour les protéines MexA et MexB ainsi que la différence de nombre d'acide aminés qui les composent, impliquent que pour chaque monomère de MexB synthétisé, la bactérie peut avoir eu le temps de synthétiser deux monomères de MexA, et pour un trimère de MexB, six monomères de MexA.



Concernant la situation *in vitro*, les ratio molaires employés sont largement supérieurs à ceux théoriquement nécessaires pour que la réaction d'assemblage atteigne son terme. En effet, dans le cas qui nous concerne, la formation du complexe étant irréversible, une stœchiométrie de six MexA pour un OprM-ND et un MexB-ND impose d'avoir au moins un ratio molaire égal à 1:1:6 pour former 100% de complexes. Or un comptage réalisé précédemment (Daury 2016) a permis d'identifier un nombre de complexes tripartites représentant au maximum 15% des objets sur la grille de microscopie en coloration négative après 6 semaines d'incubation. La cinétique lente et le faible rendement observé dans des conditions stœchiométriques pourtant favorables peut s'expliquer par la séquestration d'importantes quantités de MexA sur les faces cytosoliques des nanodisques MexB. Ces MexA improductifs, grâce à la présence de détergent, sont potentiellement mobilisables au cours du temps selon une cinétique lente d'échange entre phase lipidique et phase aqueuse. Le calcul théorique de la composition du mélange à l'équilibre indique que si 25 MexA sont piégés dans un nanodisque MexB, la proportion finale de complexe tripartite est inférieure à 24%. Ceci ne permet pas de rendre compte complètement du faible rendement observé mais contribue certainement à l'explication.







## Discussion et conclusion

### A) Organisation structurale du complexe tripartite et mode d'assemblage.

Les protéines membranaires représentent 30 % des protéines codés par les génomes des organismes vivants et sont impliquées dans des processus biologiques de première importance, de la transduction de signaux à la sécrétion de molécules effectrices dans le milieu extracellulaire. Ces protéines membranaires peuvent représenter jusqu'à 60 % des cibles des molécules à visée thérapeutique (Overington 2006) mais la détermination de leur structure par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN) est particulièrement difficile. Ainsi, sur l'ensemble des structures protéiques déterminées à ce jour, les protéines membranaires représentent moins de 1 % du total (Carpenter 2008). Les protéines membranaires nécessitent la présence de détergent afin de maintenir leur stabilité en solution et celui-ci n'est pas favorable à la formation de cristaux, en particulier concernant des super-complexes protéiques. Quant à la RMN, elle nécessite un marquage isotopique des acides aminés ce qui rend cette approche contraignante et difficile de mise en œuvre. De plus, la taille des structures protéiques ainsi résolues après un long et complexe processus d'analyse des données se limite à la centaine de résidus.

Le développement de la cryo-ME sur particules uniques pour la détermination de structures protéiques permet désormais l'obtention de résolutions atomiques rivalisant avec celles d'ordinaire obtenues par cristallographie aux rayons X, à la fois pour de petites protéines telles que la  $\beta$ -galactosidase (Bartesaghi 2018), comme pour des complexes protéiques de plusieurs MDa tels que l'ATP synthase (Guo 2018). Cette technique aujourd'hui

indispensable en particulier pour l'étude de protéines membranaires a été récompensée par l'attribution d'un prix Nobel en 2017 aux chercheurs Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson. Cette technique d'analyse permet d'étudier les macromolécules directement en solution, nécessite de faibles quantités de matière, peut faire l'objet de collecte d'images automatique et le traitement de celles-ci conduit rapidement à l'obtention d'une structure atomique.

Pour ces raisons nous avons eu recours à la cryo-ME afin de déterminer la structure du complexe MexAB-OprM reconstituée en nanodisques. Cette approche a permis la détermination d'une carte de densité 3D à une résolution de 3,8 Å et la construction d'un modèle atomique sur la base des structures cristallographiques connues de chacun des partenaires. Ce résultat est remarquable, premièrement, car il résulte de l'utilisation de protéines natives stabilisées sans détergent dans un environnement mimant les conditions physiologiques du périplasme, à savoir la bicouche lipidique des nanodisques MexB et OprM ; deuxièmement parce que le modèle atomique permet de visualiser pour la première fois une large portion des segments N-terminaux des protéines OprM et MexA qui portent une ancre lipidique insérée dans les nanodisques de OprM et MexB respectivement. La stœchiométrie du complexe tripartite ici de 3:6:3 (MexB:MexA:OprM), comprenant un trimère asymétrique du transporteur MexB, un trimère du canal OprM en conformation ouverte du fait de son interaction bout-à-bout avec l'hexamère de MexA. Le complexe, de 30 nm de long, est vraisemblablement dans une conformation de repos, prête pour l'efflux de molécules antibiotiques. L'architecture générale du complexe tripartite est similaire à celles qu'ont observé Wang *et al.*, en 2018 pour le système homologue chez *E.coli*, AcrABZ-TolC, stabilisé en Amphipols à partir de protéines chimériques AcrAB et AcrAZ. Une différence majeure existe cependant, notre complexe s'est formé en absence de substrat et présente un

canal ouvert alors que TolC n'est ouvert que lorsque les complexes AcrABZ-TolC sont pré-incubés avec des substrats ou des inhibiteurs de AcrB. Ces chercheurs ont néanmoins pu observer un complexe tripartite contenant un TolC dont l'extrémité périplasmique est toujours fermée dans le cas où le complexe n'est pas incubé en présence de substrat. Ce complexe est qualifié de forme « apo » en opposition aux complexes incubés avec un ligand ou un inhibiteur. Dans ce cas cependant, trois AcrA sont fixés à AcrB par le biais d'un pont disulfure introduit grâce aux mutations des résidus AcrAS273C-AcrBS258C, contraignant l'interaction entre le domaine lipoyl de AcrA et la boucle du sous-domaine DN de AcrB. Les trois monomères de MexA manquants viennent par la suite compléter l'hexamère mais la rigidité et l'absence de mouvement imposée par les ponts disulfures de AcrA ne permettent pas l'ouverture du canal de TolC. Il est donc envisageable que la forme apo observée par ces chercheurs ne corresponde pas à une conformation fonctionnelle en l'absence de ligand mais plutôt à un état structural bloqué artificiellement par la méthode de production du complexe. A l'inverse, notre approche utilisant des protéines natives révèle une forme « apo » semblable aux complexes dont le transporteur est activé par la présence d'un substrat ou d'un inhibiteur.

Par ailleurs, l'existence de deux assemblages aux proportions égales qui représentent environ 50 % chacun de la population totale des complexes tripartites formés, ne différant que par une rotation de 60° du trimère d'OprM, renseigne sur la séquence et le mode d'assemblage de MexAB-OprM. En effet, puisque la position de OprM en rapport de MexB est aléatoire, il faut que l'hexamère de MexA se soit formé au moment de son interaction avec OprM. L'interface MexA-OprM étant dégénérée, OprM peut amorcer l'assemblage tripartite en interagissant avec l'un ou l'autre des MexA-intra et MexA-inter conduisant aux deux types d'assemblages. La séquence d'assemblage probable que suggère notre modèle structural a ceci de provocateur qu'elle suppose une absence d'affinité forte entre MexA et MexB, supporté

dans notre cas par l'impossibilité de mettre en évidence une structure définie de ce complexe bipartite MexAB, et une formation du complexe tripartite déclenchée par OprM, qui est vectorielle et procède de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. C'est *in fine* l'interaction entre l'OMF et ses PAP qui entraîne l'héxamérisation de celles-ci, stimulant par la même occasion une interaction forte avec le transporteur MexB.

Enfin, la structure du complexe MexAB-OprM et la séquence d'assemblage proposée sont cohérentes avec une structure récemment résolue pour un système tripartite ABC chez *E. coli*, celle de la pompe MacAB-TolC (Fitzpatrick 2017). MacA forme un hexamère similaire à celui constitué par MexA et AcrA et l'interaction entre OMF et PAP se fait une fois de plus par un contact bout-à-bout (Figure 62). Dans le cas MacAB-TolC cependant, la partie périplasmique de MacB, un transporteur ABC, est fortement réduite, tout comme la possibilité de stabiliser un complexe bipartite MacAB du fait de l'absence de surface protéiques accessibles de tailles suffisantes. Ici, un assemblage déclenché par l'OMF paraît parfaitement raisonnable. Ajoutons pour finir que ce mode d'assemblage, à la fois par la séquence d'événements qui conduisent à la formation du complexe tripartite et par la structure qu'adopte ce dernier au niveau des contacts OMF-PAP, a le bénéfice d'être universel, applicable aux transporteurs RND et ABC, chez des souches bactériennes différentes, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Il serait logique que soit retrouvée une architecture similaire pour les complexes tripartites des autres familles, par exemple EmrAB-TolC représentant de la famille MFS.



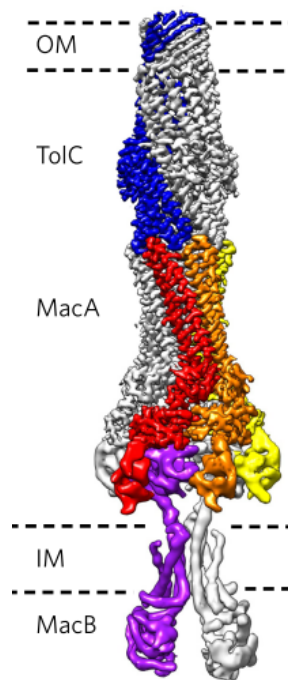


Figure 62 : Structure de la pompe MacAB-TolC. La carte de densité obtenue par cryo-ME montre un complexe de 32 nm dont la PAP MacA adopte une conformation similaire à celle observée dans notre modèle MexAB-OprM, en hexamère au contact de l'OMF par ses extrémités (Fitzpatrick 2017).

Bien que les images de microscopie électronique indiquent clairement l'existence d'un modèle long de 30 nm, démontré par notre structure de MexAB-OprM, cet assemblage tripartite ne rend pas compte de la totalité des données expérimentales concernant les systèmes d'efflux tripartites RND. En particulier, les expériences de réticulation chimique et de formation de ponts disulfures entre les différents partenaires (Lobedanz 2007, Symmons 2009) et notamment entre l'OMF et son transporteur (Tamura 2005) ne sont pas compatibles avec un modèle long. La possibilité d'une interconversion dynamique entre ces deux modèles ne paraît pas réaliste puisqu'elle nécessite une variation de l'épaisseur périplasmique de 6 nm mettant en jeu des énergies monumentales, de l'ordre du gigajoule par mole. Cependant, une détente des PAP à la suite d'un réarrangement conformationnel de leurs queues N et C-terminales est envisageable car les PAP possèdent des régions peptidiques intrinsèquement

désordonnées qui ont la propriété de subir des transitions « structuré » vers « déstructuré » et inversement, en fonction des environnements et des interactions qui les sollicitent. Dans ce cas, le passage des PAP d'une position proche de la membrane à une position décollée de la membrane serait une conséquence de leur interaction avec MexB. Une fois en position haute, les PAP peuvent commencer à interagir avec leur OMF qui finalement déclenche la formation d'un hexamère de PAP et la finalisation de l'assemblage tripartite.

## B) Stabilisation des protéines membranaires.

Les protéines membranaires, insolubles dans l'eau et sujettes à d'importants phénomènes d'agrégation, sont traditionnellement stabilisées en phase aqueuse par des détergents ou des liposomes. Ces deux systèmes s'avérant incompatibles l'un pour la formation du complexe tripartite, et l'autre pour les études structurales sur particules isolées, il a fallu se tourner vers l'outil nanodisque. Ce dernier présente l'avantage de stabiliser les protéines dans une bicouche lipidique de taille nanométrique adapté aux études par cryo-ME sur particules isolées. L'optimisation du ratio molaire lipide:MSP:protéine d'intérêt permet d'obtenir des nanodisques contenant des trimères de MexB ou d'OprM. L'ajout de MexA en détergent à ces nanodisques entraîne la formation spontanée d'assemblages tripartites. Cependant, la forte concentration en détergent pose des problèmes de stabilité des complexes purifiés et compromet les études par cryo-ME. Pour remédier à cette difficulté, la co-reconstitution de nanodisques MexAB a permis de s'affranchir du détergent dans le mélange final. Les mélanges MexAB-ND et OprM-ND ont conduit à la production d'assemblages tripartites stables et adaptés à l'étude par cryo-ME.

L'utilisation des nanodisques présente tout de même l'inconvénient de devoir ajuster le ratio molaire MSP:protéine:lipides. Cependant, la tendance naturelle des segments

hydrophobes de la MSP à s'associer aux parties hydrophobes des protéines membranaires a pu être exploitée pour la formation d'un nanodisque minimal dépourvu de lipides. La reconstitution de MexB de cette manière révèle un comportement et une structure similaires à MexB-ND à la différence qu'aucun lipide n'a pu être détecté par spectrométrie infrarouge dans les particules MexB-MSP. Ceci étend les domaines potentiels de l'utilisation des MSP au sens où désormais, il est possible d'utiliser une seule et même protéine pour la reconstitution de protéines membranaires dans un environnement sans lipides, méthode rapide et facile à mettre en œuvre, ou bien pour une reconstitution en nanodisque classique si l'effet des lipides ou d'une composition spécifique de lipides doit être étudiée.

Pour notre complexe MexAB-OprM, l'absence de formation d'assemblage tripartite en détergent alors que les complexes se forment en liposomes pointait déjà vers un rôle positif des lipides. La stabilisation des protéines MexB et OprM par reconstitution en nanodisque minimal ou par un polymère, l'amphipol, a permis de montrer que l'ajout de MexA en détergent ne conduit plus à la formation de complexes tripartites. Ces premières observations réalisées par ME sont simplement qualitatives. Le développement de méthodes quantitatives biochimiques n'a pas été concluant à cause de la difficulté à limiter l'adsorption non spécifique des protéines sur les billes permettant la purification du complexe. Le recours à une technique biophysique, la thermophorèse, est prometteur mais n'a pas été finalisé par manque de temps. Il semble cependant possible de quantifier par ce moyen les quantités de complexes présents en solution pour des conditions de mélanges différentes et évaluer précisément celles qui favorisent ou défavorisent la formation du complexe tripartite. Cette approche serait alors particulièrement intéressante pour le criblage de molécules inhibitrices du processus d'assemblage du complexe. Disposant désormais d'une structure atomique de notre complexe et ayant défini les zones de contacts entre les différents partenaires il est possible d'envisager

le développement rationnel d'inhibiteurs qui viendraient se lier spécifiquement sur les zones d'interaction entre partenaires du complexe. Une telle approche a déjà donné des résultats encourageants par utilisations de peptides synthétiques pour inhiber l'assemblage du système de sécrétion de type II (Zhang 2018).

## Matériel et Méthodes

### A) Production et purification des protéines MexA, MexB et OprM.

Les protéines du complexe tripartites sont produites et purifiées par nos collaborateurs Gilles Phan et Isabelle Broutin de l'Université Paris Descartes selon des protocoles décrits dans Mokhonov, 2005 pour MexB, Akama 2004 pour MexA et Ferrandez 2014 et Phan 2010 pour OprM. Chacune de ces protéines est exprimée dans une souche *E. coli* C43, optimisée pour la production de protéines membranaires. Une fois purifiées, MexB se trouve dans un Tampon à 0,03% en DDM, OprM 0,9 % OG et MexA 0,05% DDM.

### B) Préparation des lipides

Les lipides POPC ou d'un extrait polaire d'*E. coli* (Polar Avanti) sont dissous dans du chloroforme qui est ensuite évaporé dans un ballon en verre dans évaporateur rotatif pendant 30 min. Le film lipidique ainsi obtenu est dispersé dans un Tampon 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,01% NaN<sub>3</sub>. Une suspension de SUVs est obtenue par 5 sonications successives à 10 W de 30 s.

### C) Production et purification des MSP1D1 et MSPE3D1

Les MSP sont exprimées dans des bactéries *E. coli* BL21-Gold (DE3) selon un protocole décrit précédemment (Ritchie 2009) et purifiées par affinité de leur étiquette histidine pour une colonne nickel (Ni-NTA Invitrogen). Les fractions pures sont collectées, rassemblées et dialysées contre un Tampon 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,01% NaN<sub>3</sub> pour

éliminer l'imidazole nécessaire à l'élution.

#### D) Préparation de nanodisques et nanodisques minimaux

La reconstitution en nanodisques se fait par incubation pendant 1 heure à 4°C avec agitation d'une solution contenant la protéine d'intérêt (MexB, OprM ou MexB et MexA) et des lipides POPC ou d'extrait polaire d'*E. coli* en présence de détergent, DDM 0,05% dans les cas MexB et MexAB,  $\beta$ -OG 0,9% dans le cas de OprM ; et de sodium cholate à 15 mM final. Le Tampon de reconstitution est du Tris/HCl 10 mM pH7,4 100 mM NaCl 0,01% NaN<sub>3</sub>. Les ratios protéine:lipide:MSP employés sont de 1:82:3,5 pour OprM-ND, 1:204:6 pour MexB-ND. Ce dernier ratio est aussi utilisé dans le cas MexAB et un ratio molaire de 1:10 est respecté pour ce MexB:MexA. Le retrait des détergents se fait au moyen de Biobeads (BioRad) à raison de deux ajouts de 25 mg pour 100  $\mu$ L de reconstitution, le premier est suivi d'une incubation pendant la nuit, le deuxième d'une incubation de 4h. En fin de reconstitution, les solutions sont centrifugées 2 min à 11000g puis injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Supérose 6 équilibrée en Tampon de reconstitution et sous un flux de 50 $\mu$ L/min. Les fractions du pic d'élution sont collectées et analysées par microscopie électronique en coloration négative. Le protocole de préparation de nanodisques minimaux est identique au précédent mais sans ajout de lipides.

#### E) Préparation de MexB, MexA et OprM reconstitués en Amphipols

Les protéines pures sont incubées pendant 1h dans la glace en présence d'un excès massique égal à 2 d'Amphipols A8-35, biotynilés ou non. Après ajout de 30mg de Biobeads la solution est placée sous agitation à 4°C pendant 3h. Le mélange de reconstitution est finalement purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur Supérose 6 équilibrée en

Tampon de reconstitution et sous un flux de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  afin d'éliminer l'excès d'Amphipols.

## F) Assemblage et purification des complexes tripartites

Les mélanges MexA, MexB et OprM réalisés selon la méthode 1 dans un ratio molaire 10:1:1 contiennent une concentration finale en DDM de 0,02%. Ils sont incubés à température ambiante pendant 1 semaine puis observés par ME en coloration négative. Les mélanges MexAB, OprM réalisés selon la méthode 2, pour un ratio molaire 1:1, sont incubés 1 semaine à température ambiante avant observation en ME. Après 3 mois d'incubation, le mélange est purifié par SEC sur Supérose 6 équilibrée en Tampon de reconstitution et sous un flux de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ .

## G) Gels dénaturants SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Les échantillons sont incubés 10 min à 100 °C en présence de  $\beta$ -mercaptoethanol puis déposés sur un gel 12% (Laemmli 1970). La migration s'effectue pendant 1 h à sous tension constante de 180 V dans un Tampon Tris-Glycine à 0,1% SDS (Amresco). Les bandes protéiques sont révélées au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent selon les protocoles fournisseurs.

## H) Thermophorèse des mélanges MexAB-OprM

La protéine MSP1D1 est marquée par l'Alexa647 NHS par incubation 1 heure à température ambiante dans un ratio molaire 1:1 dans un Tampon HEPES à pH 7. La solution est centrifugée 2min sur une colonne zeba 7K équilibrée en Tampon de reconstitution afin d'éliminer l'excès de fluorophore et de stopper la réaction. L'efficacité de marquage est

estimée par une mesure d'absorbance sur un nanodrop, selon les recommandations du fournisseur.

Environ 10  $\mu\text{L}$  d'un mélange MexAB-OprM<sub>Alexa647</sub> sont prélevés par capillarité dans un capillaire premium dont les surfaces sont hydrophiles et préviennent l'adsorption de molécules hydrophobes. Ces capillaires sont introduits dans un Monolith NT.115 thermostaté à 22°C et le suivi de fluorescence se fait par excitation à 620 nm et récupération de la fluorescence émise à 680 nm, avec une puissance de 20%. Le phénomène de thermophorèse est déclenché avec une puissance laser de 20%.

## I) Microscopie Électronique à transmission en coloration négative.

Des grilles de microscopie en cuivre de 300 carreaux (Delta microscopies 300 mesh 300 Cu 3,015 mm) sont recouvertes d'une fine couche de carbone. Celle-ci est rendu hydrophile par un passage dans un glowdischarge (Cordouan Technologies) pendant 40 s à 3 mA sous un vide de  $3 \cdot 10^{-1}$  mbar. Une fois les grilles préparées, 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon y sont déposés pendant 30 s, l'excès de solution est éliminé sur un papier filtre et 5  $\mu\text{L}$  de la solution de coloration (acétate d'uranyle 2%) sont déposés sur la grille pendant 2 min. Les grilles sont observées au CM120 (Thermofisher) en microscopie à transmission à un grossissement de 35 000x sous une tension de 120 kV délivrée par une cathode d'hexaborane de lanthane. Les images sont enregistrées par une caméra CCD 2k x 2k GATAN (USC 1000). Les comptages de pompes à efflux se font par inspection de deux carreaux différents sur lesquels sont prises 10 images.

## J) Cryo Microscopie Électronique à Transmission et analyse d'images.

Ce travail a été réalisé par Marie Glavier, brièvement, les grilles Holey carbon film 200-mesh R2/1 C-Flat grids (Protochips) sont recouvertes d'oxide de graphène pendant 60s avant séchage à l'air. Une solution de protéine à 0,5 g/L est déposée sur les grilles à raison de 3  $\mu\text{L}$



puis celles-ci sont congelées dans de l'éthane liquide par EMGP (LEICA). Les images sont collectées sur un FEI Titan Krios à 300kV avec un filtre GIF (20 eV GATAN) . Le détecteur utilisé est un K2 Summit direct detector de GATAN avec une taille de pixel 1,36 Å pour une focalisation entre -1 et -2,4 µM. L'analyse d'images est réalisée dans RELION 2.1, 364 914 particules sont sélectionnées et après classification 90 853 particules sont utilisées pour la construction d'une carte de densité du complexe tripartite à 3,5 Å en symétrie C1. Le modèle atomique a été construit avec Chimera, Coot et Phenix.



## Bibliographie

- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A., Nakae, T., 2004a. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400445200>
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S.-I., Tsukihara, T., Nakagawa, A., Nakae, T., 2004b. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279, 25939–25942. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400164200>
- Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.-L., Kühlbrandt, W., 2011. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I<sub>III</sub>II<sub>IV</sub>I<sub>1</sub>. *The EMBO Journal* 30, 4652–4664. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.324>
- 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. *PNAS* 99, 11103–11108. <https://doi.org/10.1073/pnas.162039399>
- Angelis, F.D., Lee, J.K., O'Connell, J.D., Miercke, L.J.W., Verschueren, K.H., Srinivasan, V., Bauvois, C., Govaerts, C., Robbins, R.A., Ruyschaert, J.-M., Stroud, R.M., Vandebussche, G., 2010. Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *PNAS* 107, 11038–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003908107>
- Aoki, S.K., Malinverni, J.C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B.N., Remers, S., Webb, J., Braaten, B.A., Silhavy, T.J., Low, D.A., 2008. Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Molecular Microbiology* 70, 323–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06404.x>
- Bartesaghi, A., Aguerrebere, C., Falconieri, V., Banerjee, S., Earl, L.A., Zhu, X., Grigorieff, N., Milne, J.L.S., Sapiro, G., Wu, X., Subramaniam, S., 2018. Atomic Resolution Cryo-EM Structure of  $\beta$ -Galactosidase. *Structure* 26, 848-856.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.04.004>
- Bavro, V.N., Pietras, Z., Furnham, N., Pérez-Cano, L., Fernández-Recio, J., Pei, X.Y., Misra, R., Luisi, B., 2008. Assembly and Channel Opening in a Bacterial Drug Efflux Machine. *Molecular Cell* 30, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.015>
- Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., Sligar, S.G., 2006. Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.03.013>
- Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., Sligar, S.G., 2002. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* 2, 853–856. <https://doi.org/10.1021/nl025623k>
- Beveridge, T.J., 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* 76, 111–118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A., 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* 13, 620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Carpenter, E.P., Beis, K., Cameron, A.D., Iwata, S., 2008a. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology, Carbohydrates and glycoconjugates / Biophysical methods* 18, 581–586.

- <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>
- Carpenter, E.P., Beis, K., Cameron, A.D., Iwata, S., 2008b. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology, Carbohydrates and glycoconjugates / Biophysical methods* 18, 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>
- Dahmane, T., Rappaport, F., Popot, J.-L., 2013. Amphipol-assisted folding of bacteriorhodopsin in the presence or absence of lipids: functional consequences. *Eur Biophys J* 42, 85–101. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0839-z>
- Dantas, G., Sommer, M., 2014. How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *American Scientist* 102, 42. <https://doi.org/10.1511/2014.106.42>
- Delmar, J.A., Su, C.-C., Yu, E.W., 2014. Bacterial Multidrug Efflux Transporters. *Annual Review of Biophysics* 43, 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022855>
- Dörr, J.M., Koorengel, M.C., Schäfer, M., Prokofyev, A.V., Scheidelaar, S., Crujisen, E.A.W. van der, Dafforn, T.R., Baldus, M., Killian, J.A., 2014. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K<sup>+</sup> channel: The power of native nanodiscs. *PNAS* 111, 18607–18612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416205112>
- Eicher, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., Faraldo-Gómez, J.D., Pos, K.M., 2014. Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *eLife* 3, e03145. <https://doi.org/10.7554/eLife.03145>
- Eicher, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., Faraldo-Gómez, J.D., Pos, K.M., n.d. Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB 26.
- Ferrandez, Y., Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Benas, P., Ulryck, N., Falson, P., Ducruix, A., Picard, M., Broutin, I., 2012. Stoichiometry of the MexA-OprM binding, as investigated by blue native gel electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 33, 1282–1287. <https://doi.org/10.1002/elps.201100541>
- Fitzpatrick, A.W.P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J.N., Bai, X.-C., Okada, U., Murakami, S., van Veen, H.W., Zachariae, U., Scheres, S.H.W., Luisi, B.F., Du, D., 2017. Structure of the MacAB–TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nature Microbiology* 2, 17070. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.70>
- Frauenfeld, J., Löving, R., Armache, J.-P., Sonnen, A.F.-P., Guettou, F., Moberg, P., Zhu, L., Jegerschöld, C., Flayhan, A., Briggs, J.A.G., Garoff, H., Löw, C., Cheng, Y., Nordlund, P., 2016. A saposin-lipoprotein nanoparticle system for membrane proteins. *Nature Methods* 13, 345–351. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3801>
- Gorzelle, B.M., Hoffman, A.K., Keyes, M.H., Gray, D.N., Ray, D.G., Sanders, C.R., 2002. Amphipols Can Support the Activity of a Membrane Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11594–11595. <https://doi.org/10.1021/ja027051b>
- 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, 2984–2988. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.056>
- Guo, H., Suzuki, T., Rubinstein, J.L., 2018. Structure of a bacterial ATP synthase. *bioRxiv* 463968. <https://doi.org/10.1101/463968>
- Hassan, K.A., Liu, Q., Henderson, P.J.F., Paulsen, I.T., 2015. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AclE Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. *mBio* 6, e01982-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01982-14>
- Hayashi, K., Nakashima, R., Sakurai, K., Kitagawa, K., Yamasaki, S., Nishino, K.,

- Yamaguchi, A., 2016. AcrB-AcrA Fusion Proteins That Act as Multidrug Efflux Transporters. *Journal of Bacteriology* 198, 332–342. <https://doi.org/10.1128/JB.00587-15>
- Hede, K., 2014. Antibiotic resistance: An infectious arms race. *Nature* 509, S2–S3. <https://doi.org/10.1038/509S2a>
- 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. *PNAS* 109, 16696–16701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210093109>
- 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, 5847–5849. <https://doi.org/10.1128/JB.05759-11>
- Husain, F., Humbard, M., Misra, R., 2004. Interaction between the TolC and AcrA Proteins of a Multidrug Efflux System of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186, 8533–8536. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8533-8536.2004>
- Ip, H., Stratton, K., Zgurskaya, H., Liu, J., 2003. pH-induced Conformational Changes of AcrA, the Membrane Fusion Protein of *Escherichia coli* Multidrug Efflux System. *J. Biol. Chem.* 278, 50474–50482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305152200>
- Iredell, J., Brown, J., Tagg, K., 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 352, h6420. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- 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, 590–602. <https://doi.org/10.1111/mmi.12211>
- Kim, H.-M., Xu, Y., Lee, M., Piao, S., Sim, S.-H., Ha, N.-C., Lee, K., 2010. Functional Relationships between the AcrA Hairpin Tip Region and the TolC Aperture Tip Region for the Formation of the Bacterial Tripartite Efflux Pump AcrAB-TolC. *Journal of Bacteriology* 192, 4498–4503. <https://doi.org/10.1128/JB.00334-10>
- Knowles, T.J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.-P., Dafforn, T., Overduin, M., 2009. Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7484–7485. <https://doi.org/10.1021/ja810046q>
- 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, 914–919. <https://doi.org/10.1038/35016007>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes<sup>1</sup>Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Le Bon, C., Popot, J.-L., Giusti, F., 2014. Labeling and Functionalizing Amphipols for Biological Applications. *J Membrane Biol* 247, 797–814. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9655-y>
- le Maire, M., Champeil, P., Møller, J.V., 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Detergents in Biomembrane Studies* 1508, 86–111. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00010-1)
- Li, M.J., Nath, A., Atkins, W.M., 2017. Differential Coupling of Binding, ATP Hydrolysis, and Transport of Fluorescent Probes with P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs. *Biochemistry* 56, 2506–2517. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01245>
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., Plésiat, P., 2004. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and

- MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1797–1802. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1797-1802.2004>
- Lobanovska, M., Pilla, G., 2017. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med* 90, 135–145.
- 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. *PNAS* 104, 4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610160104>
- Long, A.R., O'Brien, C.C., Malhotra, K., Schwall, C.T., Albert, A.D., Watts, A., Alder, N.N., 2013. A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnology* 13, 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-41>
- Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111, 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Marie, E., Sagan, S., Cribier, S., Tribet, C., 2014. Amphiphilic Macromolecules on Cell Membranes: From Protective Layers to Controlled Permeabilization. *J Membrane Biol* 247, 861–881. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9679-3>
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H.I., Ghosh, P., 2006. Conformational Flexibility in the Multidrug Efflux System Protein AcrA. *Structure* 14, 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.11.015>
- Mokhonov, V., Mokhonova, E., Yoshihara, E., Masui, R., Sakai, M., Akama, H., Nakae, T., 2005. Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization. *Protein Expression and Purification* 40, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.002>
- Mouritsen, O.G., 2011. Lipids, curvature, and nano-medicine. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 1174–1187. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100050>
- Müller, R.T., Pos, K.M., 2015. The assembly and disassembly of the AcrAB-TolC three-component multidrug efflux pump. *Biological Chemistry* 396, 1083–1089. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0150>
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., Yamaguchi, A., 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443, 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature05076>
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A., 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587–593. <https://doi.org/10.1038/nature01050>
- Nagano, K., Nikaido, H., 2009. Kinetic behavior of the major multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *PNAS* 106, 5854–5858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901695106>
- 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, 565–569. <https://doi.org/10.1038/nature10641>
- Nath, A., Atkins, W.M., Sligar, S.G., 2007. Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins. *Biochemistry* 46, 2059–2069. <https://doi.org/10.1021/bi602371n>
- 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*. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00541>
- Numata, M., Grinkova, Y.V., Mitchell, J.R., Chu, H.W., Sligar, S.G., Voelker, D.R., 2013. Nanodiscs as a therapeutic delivery agent: inhibition of respiratory syncytial virus infection in the lung. *Int J Nanomedicine* 8, 1417–1427.

- <https://doi.org/10.2147/IJN.S39888>
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., 2006a. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., 2006b. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M.-B., Benas, P., Rety, S., Picard, M., Ducruix, A., Etchebest, C., Broutin, I., 2010. Structural and Dynamical Insights into the Opening Mechanism of *P. aeruginosa* OprM Channel. *Structure* 18, 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.018>
- Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.-L., Champeil, P., 2006. Protective and Inhibitory Effects of Various Types of Amphipols on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: A Comparative Study. *Biochemistry* 45, 1861–1869. <https://doi.org/10.1021/bi051954a>
- Piddock, L.J.V., 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Popot, J.-L., Althoff, T., Bagnard, D., Banères, J.-L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M.J., Crémel, G., Dahmane, T., de la Maza, L.M., Ebel, C., Gabel, F., Giusti, F., Gohon, Y., Goormaghtigh, E., Guittet, E., Kleinschmidt, J.H., Kühlbrandt, W., Le Bon, C., Martinez, K.L., Picard, M., Pucci, B., Sachs, J.N., Tribet, C., van Heijenoort, C., Wien, F., Zito, F., Zoonens, M., 2011. Amphipols From A to Z. *Annual Review of Biophysics* 40, 379–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155219>
- Popot, J.-L., Berry, E.A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D.M., Flötenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hervé, P., Hong, Q., Lakey, J.H., Leonard, K., Shuman, H.A., Timmins, P., Warschawski, D.E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B., Tribet, C., 2003. Amphipols: polymeric surfactants for membranebiology research. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1559–1574. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3169-6>
- Postis, V., Rawson, S., Mitchell, J.K., Lee, S.C., Parslow, R.A., Dafforn, T.R., Baldwin, S.A., Muench, S.P., 2015. The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.018>
- Prats, R., de Pedro, M.A., 1989. Normal growth and division of *Escherichia coli* with a reduced amount of murein. *J. Bacteriol.* 171, 3740–3745.
- Rammelkamp, C.H., Maxon, T., 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 51, 386–389. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>
- Rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques, n.d. 150.
- Rigaud, J.-L., Lévy, D., 2003. Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes, in: *Methods in Enzymology, Liposomes, Part B*. Academic Press, pp. 65–86. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)72004-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)72004-7)
- Rigaud, J.-L., Pitard, B., Levy, D., 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1231, 223–246. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-V)
- Ritchie, T.K., Grinkova, Y.V., Bayburt, T.H., Denisov, I.G., Zolnerciks, J.K., Atkins, W.M., Sligar, S.G., 2009. Chapter Eleven - Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs, in: Düzgünes, N. (Ed.), *Methods in Enzymology, Liposomes, Part F*. Academic Press, pp. 211–231. <https://doi.org/10.1016/S0076->

- Ruggerone, P., Murakami, S., M. Pos, K., Vargiu, A.V., 2013. RND Efflux Pumps: Structural Information Translated into Function and Inhibition Mechanisms [WWW Document]. URL <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2013/00000013/00000024/art00005> (accessed 11.6.18).
- Schad, E., Tompa, P., Hegyi, H., 2011. The relationship between proteome size, structural disorder and organism complexity. *Genome Biol.* 12, R120. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-r120>
- Schägger, H., 2002. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 12th European Bioenergetics Conference 1555, 154–159. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00271-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00271-2)
- Schmidt, T.H., Raunest, M., Fischer, N., Reith, D., Kandt, C., 2016. Computer simulations suggest direct and stable tip to tip interaction between the outer membrane channel TolC and the isolated docking domain of the multidrug RND efflux transporter AcrB. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858, 1419–1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.029>
- 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* 313, 1295–1298. <https://doi.org/10.1126/science.1131542>
- Seeger, M.A., von Ballmoos, C., Eicher, T., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., Pos, K.M., 2008. Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 199–205. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1379>
- Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., Grütter, M.G., 2006. Drug Export Pathway of Multidrug Exporter AcrB Revealed by DARPin Inhibitors. *PLOS Biology* 5, e7. <https://doi.org/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, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.001>
- Smith, H.E., Blair, J.M.A., 2014. Redundancy in the periplasmic adaptor proteins AcrA and AcrE provides resilience and an ability to export substrates of multidrug efflux. *J Antimicrob Chemother* 69, 982–987. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt481>
- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S.L., Robinson, C.V., Ilag, L.L., Heijne, G. von, Daley, D.O., 2005. Protein Complexes of the *Escherichia coli* Cell Envelope. *J. Biol. Chem.* 280, 34409–34419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506479200>
- 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, 558–562. <https://doi.org/10.1038/nature09743>
- Su, C.-C., Yang, F., Long, F., Reyon, D., Routh, M.D., Kuo, D.W., Mokhtari, A.K., Van Ornam, J.D., Rabe, K.L., Hoy, J.A., Lee, Y.J., Rajashankar, K.R., Yu, E.W., 2009. Crystal Structure of the Membrane Fusion Protein CusB from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 393, 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.029>
- Suwinska, K., Shkurenko, O., Mbemba, C., Leydier, A., Jebors, S., Coleman, A.W., Matar, R., Falson, P., 2008. Trianionic calix[4]arene monoalkoxy derivatives: synthesis, solid-state structures and self-assembly properties. *New J. Chem.* 32, 1988–1998. <https://doi.org/10.1039/B806342G>
- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., 2009. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *PNAS* 106, 7173–



7178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900693106>
- 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, 1729–1737. <https://doi.org/10.1128/JB.01441-08>
- Tal, N., Schuldiner, S., 2009. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *PNAS* 106, 9051–9056. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902400106>
- 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, 11115–11121. <https://doi.org/10.1021/bi050452u>
- Tikhonova, E.B., Dastidar, V., Rybenkov, V.V., Zgurskaya, H.I., 2009. Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes. *PNAS* pnas.0906601106. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906601106>
- Tikhonova, E.B., Yamada, Y., Zgurskaya, H.I., 2011. Sequential Mechanism of Assembly of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC. *Chemistry & Biology* 18, 454–463. <https://doi.org/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. *J. Biol. Chem.* 279, 32116–32124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402230200>
- Törnroth-Horsefield, S., Gourdon, P., Horsefield, R., Brive, L., Yamamoto, N., Mori, H., Snijder, A., Neutze, R., 2007. Crystal Structure of AcrB in Complex with a Single Transmembrane Subunit Reveals Another Twist. *Structure* 15, 1663–1673. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.023>
- 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, 697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x>
- Trépout, 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 (BBA) - Biomembranes* 1798, 1953–1960. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.019>
- Uversky, V.N., 2011. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 1090–1103. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.001>
- Vaccaro, L., Koronakis, V., Sansom, M.S.P., 2006. Flexibility in a Drug Transport Accessory Protein: Molecular Dynamics Simulations of MexA. *Biophysical Journal* 91, 558–564. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.080010>
- Vargiu, A.V., Nikaido, H., 2012. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *PNAS* 109, 20637–20642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218348109>
- Vargiu, A.V., Ramaswamy, V.K., Malvacio, I., Mallocci, G., Kleinekathöfer, U., Ruggerone, P., 2018. Water-mediated interactions enable smooth substrate transport in a bacterial efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862, 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.010>
- Ventola, C.L., 2015. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T* 40, 277–283.
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms7890>
- Wallin, E., Heijne, G.V., 2008. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from

- eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science* 7, 1029–1038. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070420>
- Wang, B., Weng, J., Fan, K., Wang, W., 2012. Interdomain Flexibility and pH-Induced Conformational Changes of AcrA Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* 116, 3411–3420. <https://doi.org/10.1021/jp212221v>
- Wang, Z., Fan, G., Hryc, C.F., Blaza, J.N., Serysheva, I.I., Schmid, M.F., Chiu, W., Luisi, B.F., Du, D., 2017. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *eLife* 6, e24905. <https://doi.org/10.7554/eLife.24905>
- Webber, M.A., Bailey, A.M., Blair, J.M.A., Morgan, E., Stevens, M.P., Hinton, J.C.D., Ivens, A., Wain, J., Piddock, L.J.V., 2009. The Global Consequence of Disruption of the AcrAB-TolC Efflux Pump in *Salmonella enterica* Includes Reduced Expression of SPI-1 and Other Attributes Required To Infect the Host. *Journal of Bacteriology* 191, 4276–4285. <https://doi.org/10.1128/JB.00363-09>
- Weeks, J.W., Bavro, V.N., Misra, R., 2014. Genetic assessment of the role of AcrB  $\beta$ -hairpins in the assembly of the TolC–AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 91, 965–975. <https://doi.org/10.1111/mmi.12508>
- Wong, K.K.Y., Brinkman, F.S.L., Benz, R.S., Hancock, R.E.W., 2001. Evaluation of a Structural Model of *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprM, an Efflux Component Involved in Intrinsic Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology* 183, 367–374. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.367-374.2001>
- Xu, Y., Lee, M., Moeller, A., Song, S., Yoon, B.-Y., Kim, H.-M., Jun, S.-Y., Lee, K., Ha, N.-C., 2011. The funnel-like hexameric assembly of the periplasmic adaptor protein in the tripartite multidrug efflux pump in gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* [jbc.M111.238535](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238535). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238535>
- Xu, Y., Sim, S.-H., Song, S., Piao, S., Kim, H.-M., Jin, X.L., Lee, K., Ha, N.-C., 2010. The tip region of the MacA  $\alpha$ -hairpin is important for the binding to TolC to the *Escherichia coli* MacAB–TolC pump. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394, 962–965. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.097>
- Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., Arakawa, S., Kinoshita, S., Kawabata, M., Fujisawa, M., 2011. Correlation of Overexpression of Efflux Pump Genes with Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Clinically Isolated from Urinary Tract Infection Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 189–194. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-10>
- Yoneyama, H., Maseda, H., Kamiguchi, H., Nakae, T., 2000. Function of the Membrane Fusion Protein, MexA, of the MexA, B-OprM Efflux Pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an Anchoring Membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 4628–4634. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4628>
- Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., Koshland, D.E., 2003. Structural Basis of Multiple Drug-Binding Capacity of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *Science* 300, 976–980. <https://doi.org/10.1126/science.1083137>
- Yu, L., Lu, W., Ye, C., Wang, Z., Zhong, M., Chai, Q., Sheetz, M., Wei, Y., 2013. Role of a Conserved Residue R780 in *Escherichia coli* Multidrug Transporter AcrB. *Biochemistry* 52, 6790–6796. <https://doi.org/10.1021/bi400452v>
- Yum, S., Xu, Y., Piao, S., Sim, S.-H., Kim, H.-M., Jo, W.-S., Kim, K.-J., Kweon, H.-S., Jeong, M.-H., Jeon, H., Lee, K., Ha, N.-C., 2009. Crystal Structure of the Periplasmic Component of a Tripartite Macrolide-Specific Efflux Pump. *Journal of Molecular Biology* 387, 1286–1297. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.048>
- Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., 2000. Cross-Linked Complex between Oligomeric Periplasmic Lipoprotein AcrA and the Inner-Membrane-Associated Multidrug Efflux Pump AcrB from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182, 4264–4267.

- <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4264-4267.2000>
- Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. Edited by I. B. Holland. *Journal of Molecular Biology* 285, 409–420. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2313>
- Zhang, Y., Faucher, F., Zhang, W., Wang, S., Neville, N., Poole, K., Zheng, J., Jia, Z., 2018. Structure-guided disruption of the pseudopilus tip complex inhibits the Type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens* 14, e1007343. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007343>
- Zoonens, M., Giusti, F., Zito, F., Popot, J.-L., 2007. Dynamics of Membrane Protein/Amphipol Association Studied by Förster Resonance Energy Transfer: Implications for in Vitro Studies of Amphipol-Stabilized Membrane Proteins. *Biochemistry* 46, 10392–10404. <https://doi.org/10.1021/bi7007596>
- Zoonens, M., Popot, J.-L., 2014. Amphipols for Each Season. *J Membrane Biol* 247, 759–796. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9666-8>
- Zwama, M., Yamasaki, S., Nakashima, R., Sakurai, K., Nishino, K., Yamaguchi, A., 2018. Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition. *Nature Communications* 9, 124. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02493-1>



**Annexe 1 : Chapitre publié dans Membrane Protein Structure  
and Function Characterization, Methods and Protocols (2017)**

# Chapter 17

## Reconstitution of Membrane Proteins into Nanodiscs for Single-Particle Electron Microscopy

Laetitia Daury, Jean-Christophe Taveau, Dimitri Salvador, Marie Glavier, and Olivier Lambert

### Abstract

The structure determination of integral membrane protein (IMP) in lipid environment is particularly challenging. Among emerging methods for exchanging detergent required for IMP purification by original compounds, the use of lipid nanodisc preserves a lipid environment. Compared with the classical method of proteoliposome formation, the nanodisc technology provides a better control of IMP molecules inserted in lipid membrane, therefore giving access to structural methodologies developed for soluble proteins. Here, we present the reconstitution of OprM membrane protein into nanodisc associated with a step of size-exclusion chromatography, an approach applicable to prepare IMPs for subsequent visualization by single-particle electron microscopy.

**Key words** Membrane protein, Nanodisc, Electron microscopy, Single-particle analysis, Multidrug efflux pump

---

### 1 Introduction

For electron microscopy (EM) and other experimental methods investigating the structure and function of integral membrane proteins (IMPs), a challenge is their extraction from their native cellular membranes to obtain a water-soluble, monodisperse, and stable IMP. In the purification step, the IMPs have been removed from the membrane usually by amphiphilic detergents. Recent methodologies have been proposed to exchange or remove the free detergent monomer and micelles by various compounds including amphiphilic polymers (amphipol) [1], small lipid nanodiscs [2], engineered  $\beta$ -sheet peptides [3], or non-exchangeable detergent [4]. Even though the choice of these compounds is related to the purpose of the experiments, the advantage of the nanodisc is such that it well mimics a lipid environment, unlike the others. Based on nascent discoidal HDL particles, nanodiscs (ND) are self-assembled systems of lipid bilayers (8–16 nm in diameter),

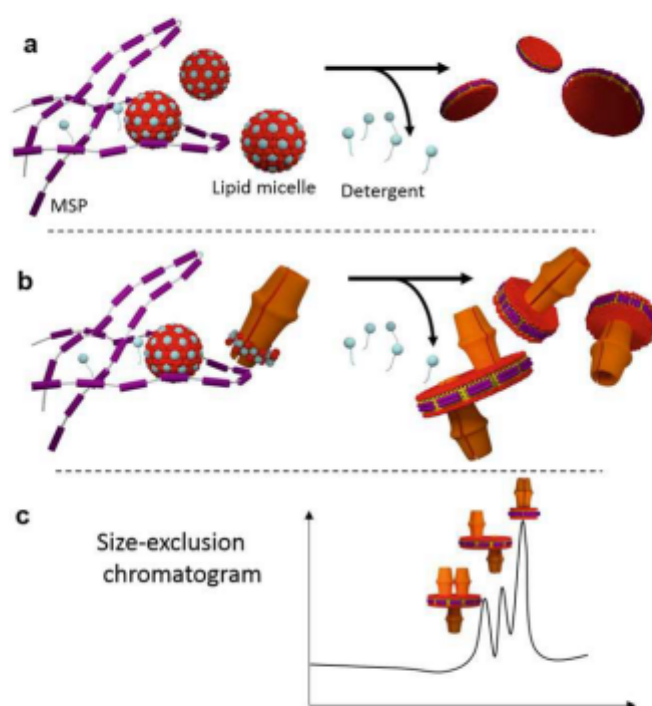
stabilized in solution by two amphipathic helical scaffold proteins [2, 5, 6]. Since 2002, a large variety of integral membrane proteins have been incorporated into NDs such as ion channels, transporters, receptors including G protein-coupled receptor, membrane enzymes. Nowadays, ND is an attractive membrane model system for biophysical and biochemical studies of membrane proteins [7]. Their functions and also interactions with ligands, proteins, and lipids have been investigated using techniques such as surface plasmon resonance, mass spectrometry, NMR, SAXS, and EM. The use of ND and single-particle analysis appears as a new trend in membrane protein structure.

In this chapter, OprM represents a typical case to illustrate the use of ND technology. OprM is an external membrane channel (50 kDa) assembled in a trimer forming an exit duct. It belongs to the prototypic bacterial MexAB-OprM multidrug efflux system that actively expels toxic substances and antibiotic out of the cell and strongly contributes to bacterial antibiotic resistance [8] of *Pseudomonas aeruginosa*—a Gram-negative bacterium—causing opportunistic infections in immuno-compromised patients and exhibiting natural and acquired resistance to diverse antibiotics. For several years, we have been working on strategies for the reconstitution of OprM [9–12] in a lipid environment. During the reconstitution process OprM molecules adopt an up-and-down orientation with respect to the lipid membrane, as many other MPs, leading to the formation of small stacks of two-dimensional (2D) arrays [9]. Using cryo electron tomography and single-particle analysis we have been able to study the overall organization of OprM membrane proteins within these stacks [12]. However, the formation of stacks precludes further other biochemical/biophysical studies of OprM. It is possible to circumvent the formation of stacks by the use of ND. Unlike liposome, NDs are very small membrane models suitable to master the reconstitution of membrane proteins. The purpose of the present methodological work, as summarized in Fig. 1, is the use of ND technology followed by size-exclusion chromatography for EM characterization of single-membrane proteins in lipid membrane. We report on the insertion of OprM in ND (OprM-ND), amenable for structural investigations.

---

## 2 Materials

1. Detergent: Octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\beta$ OG) and sodium cholate hydrate (Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA).
2. Proteins extraction buffer A: 20 mM Tris/Cl pH 8, 10% glycerol (v/v), 15 mM imidazole, 2.5%  $\beta$ OG (w/v).



**Fig. 1** General scheme of the procedure for the reconstitution of membrane protein in nanodisc (ND) for single-particle electron microscopy analysis. **(a)** Reconstitution of ND. From MSP and lipid/detergent micelles, detergent removal leads to the formation of flat lipid ND. **(b)** Reconstitution of IMP into ND. IMP in detergent is added to the mixture in **(a)**. After detergent removal, one or few copies of IMP are inserted into ND. **(c)** The separation/purification of the various species is performed by size-exclusion chromatography (SEC)

3. Lipid: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA).
4. Reconstitution buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris/Cl, pH 7.4).
5. Affinity purification: nickel-charged affinity Ni-NTA agarose resin and Polypropylene columns (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Washing buffer 1: 40 mM Tris/Cl, 0.3 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0; Washing buffer 2: 40 mM Tris/Cl, 0.3 M NaCl, 50 mM Na-cholate, 60 mM imidazole, pH 8.0; Washing buffer 3: 40 mM Tris/Cl, 0.3 M NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0. Elution buffer: 40 mM Tris/Cl, 0.3 M NaCl, 0.4 M imidazole.



6. Dialysis buffer MSP: 20 mM Tris/Cl, 0.1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 7.4 at 4 °C.
7. Dialysis buffer OprM: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% glycerol (v/v), and 0.9%  $\beta$ OG (w/v).
8. Detergent removal: SM2 Biobeads (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
9. Plasmid: pMSP1D1 from pET28a (Addgene, Cambridge, MA, USA).
10. Bacteria: BL21-Gold (DE3) Competent *E. coli* cells (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
11. Resuspension buffer: 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride.
12. Reconstitution solution: 10 mM Tris/Cl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.9%  $\beta$ OG and 15 mM Na-cholate.
13. Gel filtration: AKTAmicro with a Superdex 200 PC 3.2/30 column (GE Healthcare, Little Chalfont, Great Britain).
14. SEC buffer: 10 mM Tris/Cl, pH 7.4 and 100 mM NaCl.
15. Specimen preparation for TEM, carbon copper grid (Cu 300 mesh, Agar Scientific, Stansted, Great Britain) and a glow discharge apparatus for carbon treatment (Elmo, Cordouan Technologies, Pessac, France).
16. Transmission electron microscope: FEI F20 (equipped with Field Emission Gun, FEG) operated at 200 kV, and a camera 2 k  $\times$  2 k (Gatan, Inc., Pleasanton, CA).
17. Computer for image analysis: standard workstation.

---

### 3 Methods

#### 3.1 Lipid Preparation

1. Dissolve POPC lipids in chloroform, dry onto a glass tube under steady flow of nitrogen, and expose to vacuum for 1 h.
2. Suspend the lipid film in the reconstitution buffer and subject to five rounds of sonication for 30 s each.
3. Lipid concentration was quantified by phosphate analysis.

#### 3.2 Protein Purifications

The MSP1D1 membrane scaffold protein expressed and purified from bacteria [13], was used to make OprM nanodiscs (see Note 1). Briefly, MSP1D1 is obtained as follows:

1. *E. coli* strain BL21 Gold (DE3) is transformed with pMSP1D1 plasmid.
2. Inoculate 5 mL of Luria Broth (LB) medium containing kanamycin (30 mg/L) with a single colony from a freshly streaked

plate and incubate at 37 °C with shaking at 200 rpm until the OD600 is approximately 0.4–0.6.

3. Add the starting culture to 200 mL of LB containing kanamycin (30 mg/L) and incubate at 37 °C with shaking at 200 rpm until the OD600 is approximately 1.5.
4. Add 1 mM IPTG for 2 h at 37 °C under shaking at 200 rpm.
5. Harvest the cells by centrifugation at 4000 × *g* for 30 min. The cell pellet is stored at –80 °C.
6. The bacteria cell pellet is resuspended in resuspension buffer. After the cells are completely resuspended, add 1% Triton X-100, deoxyribonuclease I (25 mg/L), and 50 mM imidazole.
7. Three 1 min rounds sonication permit to lyse the cells.
8. The lysate is then clarified by centrifugation at 30,000 × *g* for 30 min.
9. The lysate is loaded on a nickel-charged affinity Ni-NTA agarose resin in a polypropylene column, equilibrated with 40 mM phosphate buffer, pH 7.4.
10. Incubate for 2 h at 4 °C on a rotating wheel. The column is washed once with washing buffers 1, 2, and 3.
11. MSP1D1 is eluted with elution buffer. 0.5 mL fractions are collected and protein is checked on SDS-PAGE.
12. The fractions containing MSP1D1 are pooled, the sample is dialyzed against dialysis buffer MSP overnight, and stored with 0.01% NaN<sub>3</sub> one week at 4 °C or at –80 °C for long-term storage (*see Note 2*).

For OprM membrane protein, purification starts as a standard scheme, with the total solubilization of protein-enriched membranes by detergent. Then, after several purification steps, the protein is purified at a high concentration and maintained soluble in the presence of detergent. The expression and purification of OprM transmembrane proteins follow this standard method [9]. Briefly,

1. The membrane envelopes from broken *E. coli* cells were solubilized in protein extraction buffer A overnight at 20 °C.
2. The solubilized membrane proteins were loaded onto a Ni-NTA resin column and then were eluted with a linear gradient of imidazole (60–500 mM).
3. The fractions containing the OprM protein were pooled and concentrated to 5 mg/mL.
4. Finally, OprM was exchanged for suitable buffer by dialysis against dialysis buffer OprM.

OprM is trimeric in solution and forms a cylindrical structure composed of a transmembrane  $\beta$  barrel and 12 long  $\alpha$  helices protruding to the solvent.

### 3.3 Reconstitution of OprM into Nanodisc

OprM is inserted into nanodiscs (OprM-ND) according to the standard protocol [13, 14] (*see Note 3*). Briefly, OprM-ND is obtained as follows:

1. OprM solution is mixed with POPC solution and MSP solution at a final 36:1:0.4 lipids/MSP/protein molar ratio in reconstitution solution for 1 h incubation on ice.
2. Add 200 mg wet SM2 Bio-beads (BB) per ml (corresponding to a ratio BB/detergent of 2 w/w), to remove detergent with gentle agitation to keep the beads suspended, overnight at 4 °C.
3. Add a second amount of BB for 4 h to remove the residual detergent.
4. Then pipette off the supernatant and store at 4 °C for further analysis (*see Note 4*).

### 3.4 Preparation of Negatively Stained Samples

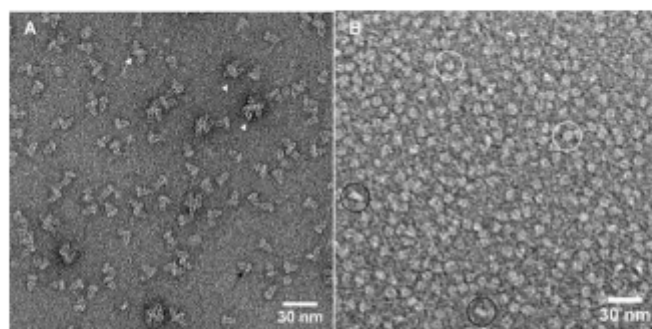
1. The carbon grid is placed inside a glow discharge apparatus to render carbon hydrophilic. Typically, the grid is submitted to a faint red/blue glow for -40 s under a low pressure of  $3 \times 10^{-1}$  mbar.
2. The sample is then deposited on the carbon side for 30 s and the excess is then removed by touching the edge of the grid with a filter paper.
3. Immediately pipette 5  $\mu$ L of 2% uranyl acetate solution on the top of the sample and leave it for 2 min. Then remove the excess removed by touching the edge of the grid with a filter paper.
4. Air-dry the grid and store in a plastic box up to EM observation (*see Note 5*).

### 3.5 Electron Microscopy Observation

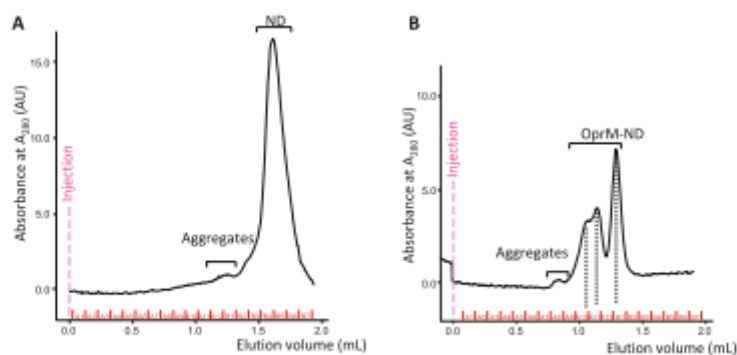
1. Insert the grid into the electron microscope.
2. At low magnification ( $\times 300$ ), search for a homogeneous distribution of the sample and of stain as well.
3. On the selected squares, record the images in the low dose mode condition (Fig. 2). Briefly, the region of interest (ROI) is defined in search mode ( $\sim \times 3000$ ). The “low dose” setting enables exposing the ROI only for recording the image (exposure mode  $\times 50,000$ ), the defocus setting being adjusted out the ROI with the focus mode ( $\times 50,000$ ).

### 3.6 Protein Purification by Size Exclusion Chromatography

To sort out the population of OprM-ND according to the number of molecules per ND, the OprM-ND sample was subjected to size exclusion chromatography (SEC) using a Superdex 200 PC 3.2/30 column at a flow rate of 0.03 mL/min (Fig. 3).



**Fig. 2** Negative-stained electron microscopy of OprM molecules inserted in ND (OprM-ND). **(a)** Typical EM image of OprM inserted into ND. OprM molecules are viewed with their long axis preferentially oriented parallel to the carbon support. NDs contain one (*black arrow*), two (*white arrow*), and three OprM molecules (*white arrowheads*), exhibiting a certain reconstitution heterogeneity. **(b)** EM image of reconstitution of ND without the addition of IMP showing top views (*white circles*) and side views (*black circles*). Scale bars 30 nm



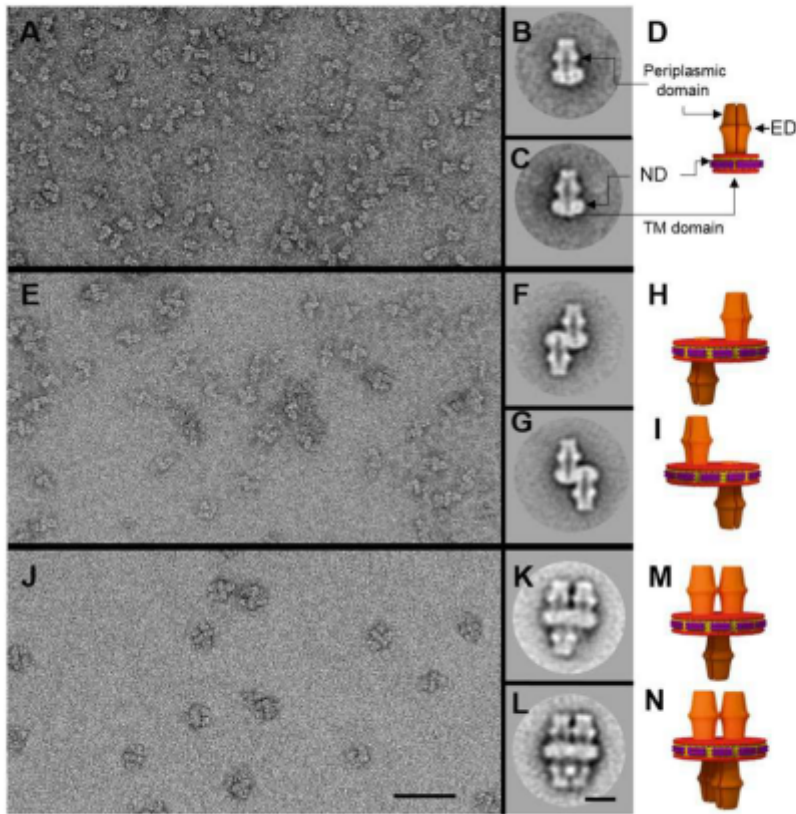
**Fig. 3** Separation of OprM-ND population by SEC. **(a)** Elution profile from ND reconstitution with MSP. After detergent removal, the sample was injected onto a Superdex 200 PC 3.2/30 at a flow rate of 0.03 mL/min. The main peak (B4-B5 fractions) corresponds to NDs. **(b)** Elution profile of OprM-ND after assembly. After detergent removal, the sample was injected onto a Superdex 200 1 PC 3.2/30 column at a flow rate of 0.03 mL/min. Separated peaks corresponding to OprM-ND population were obtained and subsequently characterized by EM. *Dashed lines* in panel **(b)** indicate the fractions (A10, A11, B1) analyzed by EM in Fig. 4

1. Pre-equilibrate the column with 1 mL of SEC buffer.
2. Inject 60  $\mu$ L OprM-ND sample.
3. Elute with 1.5 mL of SEC buffer.
4. Elution profile of protein was followed at 280 nm.
5. Peak fractions (100  $\mu$ L) were collected and analyzed by EM.

### 3.7 2D Single-Particle Image Analysis

The single-particle analysis consists in (1) extracting subimages (particles), (2) aligning them (rotation and translation), and (3) calculating averages of homogeneous populations. As these procedures are intensively used in single-particle methods, we recommend the use of software usually devoted for these tasks. Here, examples of commands of SPIDER [15] are presented but other software like EMAN2 [16] can be used (Fig. 4).

1. *Extraction of subimages.* This initial step consists in selecting from the EM micrographs subimages containing each, one particle. For the sake of convenience during the 2D alignment process, the extracted subimages must be squared. For proteins exhibiting an elongated shape (like OprM), a larger bounding box is required. Particles are selected automatically using either the EMAN Boxer automatic selection tool (e2boxer.py) or any picking tools supporting Difference of Gaussians (DoG) filter that is very suitable to pick particles on negative staining micrographs (see Note 6). The output of this step is a collection of subimages, each containing one particle.
2. *2D Alignment of the subimages.* This step relies on a rotational and a translational alignment of the subimages using a so-called Reference-free alignment method. The latter consists in an iterative process using a floating temporary reference to align the images. Since this reference is always recalculated, it does not deeply influence the alignment process. In SPIDER, the commands AP RA (rotational alignment) and AP SA (translational alignment) are repeated during eight cycles.
3. *Principal component analysis.* This step consists in the classification of aligned subimage collection to sort out homogeneous populations. It is first done by running a Principal Component Analysis (PCA) using the command CA S in SPIDER and by setting the option PCA.
4. *Cluster generation with K-means.* K-means is a statistical method enabling extracting K homogeneous clusters from a data collection (see Note 7). In the negative staining EM project, the number of clusters (K number) is estimated such as a cluster contains 50–100 subimages. For example, for a set of 500 aligned particles, K must be set to 10. In SPIDER, the command CL KM takes as input the IMC file previously generated during the PCA step and by setting an appropriate K number.
5. *Average computation from the homogeneous clusters.* Finally, for each cluster created during the K-means step, an average image is calculated using the SPIDER command AS S.



**Fig. 4** EM analysis of OprM-ND fractions. *Upper row (A–D)* EM of B1 fraction. (A) Negative-stained micrograph. (B, C) Two typical image averages calculated from 76 (B) and 57 images (C) respectively (over a total of 4750 selected particles) showing one OprM molecule per ND. OprM-ND revealed a 11 nm in diameter ND spanned by a duct formed by the transmembrane  $\beta$ -barrel domain (TM), visible due to the presence of uranyl acetate within the  $\beta$ -barrel and, followed by the 10-nm-long periplasmic domain including the equatorial domain (ED) (D). *Middle row (E–I)* EM of A11 fraction. (E) Negative-stained micrograph exhibiting a vast majority of two OprM molecules per ND. (F, G) Among 404 selected particles, averages of two clusters of 105 (F) and 132 images (G) respectively differing in a 180° rotation about a vertical axis. The two OprM molecules are inserted on opposite sides of ND, as schematically drawn in (H) and (I). *Lower row (J–N)* EM of A10 fraction. (J) Negative-stained micrograph exhibiting a majority of OprM-ND containing several OprM molecules. (K, L) From 774 selected particles, typical average images of 59 (K) and 60 images (L) revealing OprM-ND containing three and four OprM molecules respectively as schematically drawn in (M) and (N).

---

## 4 Notes

1. Among the available MSPs, MSP1D1 is the shortest. The others have extra  $\alpha$  helices designed to increase the ND diameter to accommodate large IMPs. The choice of MSP should be guided by the diameter of the transmembrane part of IMP. As a simple rule, the size of the latter should be less than that of ND made with the selected MSP. For OprM the  $\beta$  barrel domain is about 7 nm while ND are 9–10 nm in diameter.
2. Long-time conservation of MSP: Our recommendation to maintain an optimal efficacy of ND production is to use MSP as fresh as possible. From our feedback, MSP stock at  $-80^{\circ}\text{C}$  was useable for only three months. Beyond this delay, the quality of ND production starts to decrease.
3. In practice, as shown here, ND diameters have been remarkably expanded by the incorporation of more than one molecule per ND, exhibiting a more extended conformational adaptability than the one described in [3]. Therefore in addition to the MSP length, its conformational flexibility is also a parameter to deal with for membrane protein reconstitution into ND.
4. Long-time preservation of OprM-ND: When OprM was reconstituted in ND, it can be stored over months at  $4^{\circ}\text{C}$  without notable protein destabilization or aggregation. Protein in ND looks apparently very stable and possibly more than in detergent.
5. According to the literature, the production of ND only containing lipids is very reproducible with a regular diameter. The insertion of an integral membrane protein imposes additional constraints on ND diameter. ND diameter is slightly larger in the presence of MP exhibiting a conformational adaptability of MSP.
6. The automatic picking works well when the sample is well spread on the EM grid, meaning that the particles should not be close to each other. When the automatic picking fails, the particle selection should be done manually.
7. Defining the optimal  $K$  number may require several attempts. It is recommended to perform several times the “cluster generation” step with different  $K$  values. Clusters should exhibit discernible features or different orientations of the particle.

---

## Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. Isabelle Broutin and Martin Picard for providing purified OprM protein sample. Celine

Gounou for technical assistance. This work has been supported in part by Agence Nationale de la Recherche (Assembly ANR-12-PCV1-010) and Conseil Régional d'Aquitaine (20121301007) grants.

## References

1. Tribet C, Audebert R, Popot JL (1996) Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15047–15050
2. Nath A, Atkins WM, Sligar SG (2007) Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry (Mosc)* 46:2059–2069
3. Tao H et al (2013) Engineered nanostructured  $\beta$ -sheet peptides protect membrane proteins. *Nat Methods* 10:759–761
4. Hauer F et al (2015) GraDeR: membrane protein complex preparation for single-particle cryo-EM. *Struct Lond Engl* 1993 (23):1769–1775
5. Bayburt TH, Grinkova YV, Sligar SG (2002) Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett* 2:853–856
6. Segrest JP et al (1999) A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem* 274:31755–31758
7. Schuler MA, Denisov IG, Sligar SG (2013) Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)* 974:415–433
8. Nikaido H, Pagès J-M (2012) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 36:340–363
9. Lambert O et al (2005) Trimeric structure of OprN and OprM efflux proteins from *Pseudomonas aeruginosa*, by 2D electron crystallography. *J Struct Biol* 150:50–57
10. Trépout S et al (2007) Membrane protein selectively oriented on solid support and reconstituted into a lipid membrane. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 23:2647–2654
11. Trépout S et al (2007) Organization of reconstituted lipoprotein MexA onto supported lipid membrane. *Eur Biophys J* 36:1029–1037
12. Trépout S, Taveau J-C, Lambert O (2010) Structure determination of membrane protein by both cryo-electron tomography and single particle analysis. *Methods Mol Biol (Clifton NJ)* 654:207–220
13. Ritchie TK et al (2009) Chapter 11—reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol* 464:211–231
14. Denisov IG, Grinkova YV, Lazarides AA, Sligar SG (2004) Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc* 126:3477–3487
15. Frank J et al (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* 116:190–199
16. Tang G et al (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol* 157:38–46