



Master Biologie structurale, génomique
Parcours : Biochimie structurale (BS)
Année 2024-2025

PROPOSITION DE STAGE DE M2 pour l'année 2024-2025

[Institut Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie - IM2B | Aix-Marseille Université \(univ-amu.fr\)](#)

Laboratoires : Membranes et Cibles Thérapeutiques (MCT) Inserm U1261, UMR_MD1 ; Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) CNRS UMR 7281

Equipes d'accueil : MCT/BIP07 Biophysique des métalloprotéines

Responsables du stage : Muriel Masi (PhD HDR MCU AMU, MCT) ; muriel.masi@univ-amu.fr; Marlène Martinho (PhD HDR MCU AMU, BIP) mmartinho@imm.cnrs.fr

Adresses : Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille ; 31 Chemin Joseph Aiguier, 13400 Marseille

Titre : Mesure de la translocation d'antibiotiques à travers les porines par résonance paramagnétique électronique (RPE)

Etat actuel des connaissances sur le sujet :

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente une menace croissante pour la santé humaine et animale dans le monde entier. En Europe, celle-ci est responsable d'environ 25 000 morts par an ; et les frais médicaux associés aux coûts sociaux qui en résultent sont estimés à quelques 1,5 milliards d'euros par an. De nouvelles formes de résistance apparaissent et se répandent, laissant aux cliniciens peu de possibilités pour contrôler les infections. En même temps, malgré le besoin reconnu de développer de nouvelles molécules efficaces, la réalité est telle que seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques ont été introduites sur le marché au cours de ces trois dernières décennies. Sur le plan scientifique, il est urgent de mieux comprendre comment les antibiotiques fonctionnent, comment la résistance se développe, et quels mécanismes moléculaires pourraient être exploités pour détourner la résistance bactérienne. Entre 2013 et 2018, le programme de recherche européen IMI-TRANSLOCATION visait à mieux comprendre le transport et l'accumulation des antibiotiques ainsi que l'émergence de la multirésistance chez les bactéries à Gram-négatif problématiques appartenant au groupe de pathogènes ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*). Des résultats significatifs ont été obtenus concernant (i) la translocation des antibiotiques à travers les porines générales de la membrane externe ; (ii) l'impact des pompes d'efflux sur l'accumulation et l'activité des antibiotiques chez les entérobactéries.

Problématique du projet proposé et approche rationnelle :

L'efficacité des antibiotiques dépend de leur capacité à s'accumuler à l'intérieur des bactéries jusqu'à ce qu'ils atteignent une concentration seuil pour interagir avec leur(s) cible(s) et inhiber leur activité. Cependant, la membrane externe des bactéries à Gram négatif est très imperméable et les antibiotiques diffusent à travers le canal étroit des porines. Mais ils sont en même temps des substrats de pompes d'efflux transmembranaires qui les expulsent¹. Ainsi, de nombreux isolats cliniques multirésistants aux antibiotiques présentent des modifications fonctionnelles ou une perte des porines, associées à une surproduction de pompes d'efflux.

Les porines représentent une fraction substantielle du nombre total de protéines OM et favorisent la diffusion de solutés d'une masse moléculaire allant jusqu'à 600 Da. *E. coli* produit deux principales porines générales : OmpC et OmpF¹. Les canaux OmpF/C présentent une forme de sablier, la partie la plus étroite étant appelée zone ou région de constriction (ZC) en raison du repliement de la boucle L3. La boucle L3 génère également un fort champ électrique transversal à travers la ZC, résultant d'une

Master Biologie structurale, génomique
Parcours : Biochimie structurale (BS)
Année 2024-2025

rangée de résidus chargés positivement sur la paroi du tonneau faisant face à des résidus chargés négativement sur la boucle L3. Ce champ électrique a des conséquences directes sur la perméation moléculaire². Les structures de plusieurs orthologues OmpF/C ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Malgré des similitudes structurales, les porines OmpC possèdent un rayon de pores plus petit, une conductance plus faible, une sélectivité cationique plus élevée et une intensité de champ électrique transversal plus faible. Les expériences de prédiction des perméabilités et de gonflement des liposomes ont montré que la charge atomique et la taille des solutés constituent des limitations majeures à leur diffusion à travers les porines³. Nous avons récemment montré que la ceftazidime (CAZ), qui présente une charge négative nette, est active sur les bactéries exprimant les porines OmpF. En revanche, le céfépime zwitterionique (FEP) tue les bactéries quelle que soit la porine exprimée. La quantification des molécules accumulées par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et les expériences sur des systèmes isolés ont confirmé que CAZ présente une préférence pour OmpF pour pénétrer dans les bactéries⁴.

La spécificité des porines vis-à-vis des antibiotiques est une question importante pour l'efficacité des antibiotiques et le développement de nouvelles molécules antibactériennes. Ici, notre objectif est de développer une approche utilisant la biochimie des protéines et la biophysique (*Site-directed spin labeling* (SDSL) *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) *spectroscopy*) afin de mesurer des différences d'affinité entre molécules antibactériennes et les porines. Les porines purifiées Omp35 et Omp36 de *K. aerogenes* seront reconstituées dans des liposomes selon un protocole favorisant l'orientation « *outside-out* ». Dans un premier temps, l'orientation de ces porines sera testée. Pour cela, des substitutions en cystéine seront réalisées dans des boucles extra- et intracellulaires des deux porines. La fonctionnalité et la structure globale de tous les mutants générés et purifiés seront analysés par des tests phénotypiques *in vivo* et par dichroïsme circulaire *in vitro*. Les protéoliposomes contenant ces variants reconstitués seront alors incubés avec un fluorophore spécifique des cystéines, et extincuteur de fluorescence imperméable aux membranes en absence ou en présence de détergent⁵. De la même façon, l'extinction du signal RPE de la protéine marquée avec un marqueur de spin de type nitroxyde sera étudiée en fonction de l'orientation de la protéine. Une analyse biophysique complète (taille, hétérogénéité) sera réalisée sur les protéoliposomes formés avant et après incorporation de la protéine marquée (sonde fluorescente ou sonde nitroxyde) par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS).

Dans un second temps, les changements de conformation potentiels des porines Omp35 et Omp36 en présence d'antibiotiques seront analysés. Pour cela, nous avons sélectionné des acides aminés dans Omp35 et Omp36 situés en dessus et en dessous de la ZC qui seront individuellement substitués en cystéine pour un marquage avec une sonde magnétique. Tous les mutants ont été générés par mutagenèse dirigée en utilisant les plasmides pColdIV-*omp35/36* comme matrices et exprimés dans BL21Δ*omp8*. Les niveaux d'expression des mutants ainsi que leur localisation correcte à la membrane externe seront testés avant purification par chromatographie échangeuse d'ions (protocole interne MCT). En parallèle, les mêmes mutations seront générées dans les plasmides pBAD24-*omp35/36* pour confirmer qu'elles n'affectent pas la sensibilité aux antibiotiques chez *E. coli* K12. Les protéines mutantes Cys seront marquées avec une sonde nitroxyde et les spectres RPE seront analysés en l'absence et en présence d'antimicrobiens (FEP et CAZ). Des changements spectraux sont attendus si l'antibiotique entre en contact avec la sonde nitroxyde et établit des interactions favorables lui permettant de traverser la région de constriction et d'atteindre la sortie du canal⁶⁻⁸. Le résultat positif de ces expériences fournira un test *in vitro* rapide et puissant pour cribler toute une bibliothèque

Master Biologie structurale, génomique
Parcours : Biochimie structurale (BS)
Année 2024-2025

chimique d'antimicrobiens et déterminer la capacité de certaines molécules à pénétrer à travers les porines des entérobactéries.

Techniques utilisées :

- Microbiologie : détermination de concentrations minimales inhibitrices
- Biochimie : purification et reconstitution de protéines membranaires en protéoliposomes et tests d'orientation
- Biophysique : SDSL-EPR, CD, DLS

Références bibliographiques :

1. Masi M, Réfrégiers M, Pos KM, Pagès JM. Mechanisms of envelope permeability on antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol.* 2017, 2:17001.
2. Vergalli J, Bodrenko I, Masi M, Moynie L, Acosta-Gutiérrez S, Naismith JH, Anne Davin-Régli, Ceccarelli M, van den Berg B, Winterhalter M, Pagès JM. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2019, 18:164-76.
3. Acosta-Gutiérrez S, Ferrara L, Pathania M, Masi M, Wang J, Bodrenko I, Zahn M, Winterhalter M, Stavenger RA, Pagès JM, Naismith JH, van den Berg B, Page MGP, Ceccarelli M. Getting drugs into Gram-negative bacteria: rational rules for permeation through general porins. *ACS Infect Dis.* 2018, 4:1487-98.
4. Masi M, Vergalli J, Ghai I, Barba-Bon A, Schembri T, Nau WM, Lafitte D, Winterhalter M, Pagès JM. Cephalosporin translocation across enterobacterial OmpF and OmpC channels, a filter across the outer membrane. *Commun Biol.* 2022, 5:1059.
5. Deutschmann S, Rimle L, von Ballmoos C. Rapid estimation of membrane protein orientation in liposomes. *Chembiochem.* 2022, 23:e202100543.
6. Martinho M, Fournier E, Le Breton N, Mileo E, Belle V. Electron Paramagnetic Resonance. *The Royal Society of Chemistry.* 2018, 26:-88.
7. Di Cesare M, Kaplan E, Rendon J, Gerbaud G, Valimehr S, Gobet A, Ngo TT, Chaptal V, Falson P, Martinho M, Dorlet P, Hanssen E, Jault JM, Orelle C. The transport activity of the multidrug ABC transporter BmrA does not require a wide separation of the nucleotide-binding domains. *J Biol Chem.* 2024, 300:105546.
8. Bizet M, Byrne D, Biaso F, Gerbaud G, Etienne E, Briola G, Guigliarelli B, Urban P, Dorlet P, Kalai T, Truan G, Martinho M. Structural insights into the semiquinone form of human Cytochrome P450 reductase by DEER distance measurements between a native flavin and a spin labelled non-canonical amino acid. *Chemistry.* 2024, 26:e202304307.