

Caractérisation topologique de la protéine MalG du transporteur ABC d'*Escherichia coli*

BENTAHAR Mohamed-Chérif^{1*}, LAI Thanh-lan², VALERIO-LEPINIEC Marie³, BENBOUZIANE Bouasria⁴, BENABDELMOUMENE Djilali¹, MINARD Philippe³

¹ Laboratoire de Physiologie Animale Appliquée (LPAA), Université de Mostaganem, Algérie.

² Institut de Biologie et Technologies de Saclay (IBiTeC-S), CNRS URA 2096, Bât 532, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

³ Institut de Biochimie Moléculaire et Cellulaire (IBBMC), Univ Paris Sud, UMR 8619, Orsay, F-91405 Orsay, France

⁴ Laboratoire de Bioéconomie, Université de Mostaganem, Algérie

ARTICLE INFO

Mots clés:

Transport de sucre
Protéines membranaires
Transporteur ABC
MalG
Escherichia coli

R É S U M É

La cellule à laquelle nous nous intéressons est l'entérobactérie *Escherichia coli*. On trouve dans ses membranes tous types de protéines de transport (pompes, canaux et transporteur) ; elle peut donc fournir un modèle simple d'étude sur les protéines impliquées dans les échanges de solutés à travers une membrane biologique.

La protéine MalG est une protéine de la membrane interne d'*Escherichia coli*. En association, avec la protéine MalF et deux protéines MalK et Mal E, forment le complexe de translocation des sucres à travers la membrane. La structure secondaire de MalG contient de multiples segments α -hélice transmembranaires qui sont constitués de résidus d'acides aminés hydrophobes, facilitant ainsi son insertion dans la membrane.

Nous avons déterminé la topologie correcte de la protéine MalG pour l'insertion dans la membrane interne d'*Escherichia coli* avec le système de fusion de gènes MalG/PhoA. Globalement, MalG possède 6 segments transmembranaires dénombrant 296 résidus d'acides aminés, et des régions C-terminale et N-terminale hydrophiles.

1.Introduction

Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) constituent une super-famille de complexes membranaires ubiquitaires essentiels à la survie de l'organisme (Holland, 2011). Elles sont présentes dans toutes les espèces vivantes, des archées à *Homo sapiens* (Goffeau, De Hertogh, & Baret, 2004). Ses gènes représentent jusqu'à 4 % du génome complet des bactéries telles que *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* (Goffeau et al., 2004) ; Les protéines ABC catalysent une grande variété de fonctions physiologiques, dont beaucoup, mais pas toutes, sont liées au transport. et translocation active d'une grande variété de molécules à travers les membranes biologiques (Goffeau et al., 2004; Jacobo-Albavera, Domínguez-Pérez, Medina-Leyte, González-Garrido, & Villarreal-Molina, 2021; Locher, 2016).

Les transporteurs ABC sont également connus sous le nom de

pompes à efflux car ils assurent le transport transmembranaire de diverses molécules endo- et xénobiotiques grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Par conséquent, les transporteurs ABC ont été considérés comme étroitement liés à la multirésistance aux médicaments (MDR) dans le cancer, où l'efflux de médicaments chimiothérapeutiques structurellement distincts entraîne une réduction de l'efficacité thérapeutique (Wu et al., 2021). Au cours des dernières décennies, des efforts considérables ont été déployés pour comprendre la relation structure-fonction, le profil de transport des transporteurs ABC, ainsi que la possibilité de surmonter la MDR en ciblant ces transporteurs (Wang et al., 2021).

Ils sont constitués de deux domaines transmembranaires formant une voie de translocation et deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) qui couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport (Rees, Johnson, & Lewinson, 2009; ter Beek, Guskov, & Slotboom, 2014). La plupart des ABC nécessitent une protéine de liaison soluble supplémentaire

*Corresponding author.

E-mail address: mc.bentahar@gmail.com

Received 27 October 2022; Received in revised form 20 February 2023;

Accepted 01 March 2023

qui reconnaît le substrat et l'achemine vers les domaines transmembranaires (Eitinger, Rodionov, Grote, & Schneider, 2011; Rice, Park, & Pinkett, 2014)

Le système de transport du maltose chez *Escherichia coli*, qui est responsable de l'absorption des α -(1→4) maltodextrines linéaires jusqu'au maltoheptose (Boos & Shuman, 1998) fait partie de la superfamille des ABC les mieux caractérisés (Bordignon, Grote, & Schneider, 2010; Chen, 2013; Orelle, Oldham, & Davidson, 2014), ce système est appelé MalEFGK₂ (figure 1), où MalE est une la protéine périplasmique de liaison au maltose (MBP), MalF et MalG sont des protéines intégrales de la membrane formant le pore, et deux MalK forment un homodimère de NBD, ces quatre protéines forment le complexe de translocation des sucres à travers la membrane. (Davidson & Nikaido, 1991) (Oldham & Chen, 2011) ; en général ce système sert de modèle pour les importateurs canoniques des ABC en général. En effet le transporteur de maltose d'*Escherichia coli* est largement étudié depuis plusieurs décennies comme prototype afin d'élucider le mécanisme fondamental des transporteurs ABC (Bordignon et al., 2010; Orelle et al., 2014).

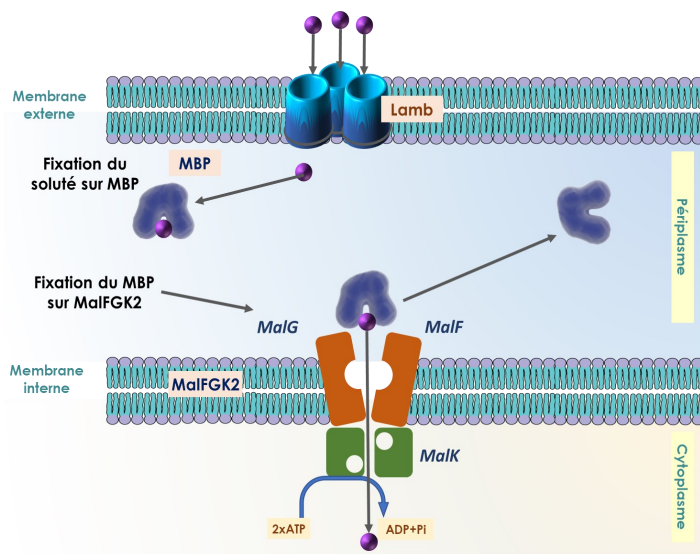


Fig. 1. Représentation schématique du transporteur ABC de maltose (Oldham et al 2013)(Hiller et al 2020).

La richesse des données génétiques, biochimiques et structurales du transporteur de maltose a permis donc une analyse détaillée des événements moléculaires qui permettent le couplage de l'hydrolyse de l'ATP au translocation du substrat (Chen, 2013).

Le but de ce travail est de déterminer l'organisation topologique de la protéine MalG dans la membrane bactérienne en étudiant l'activité des protéines chimères comportant une partie de MalG (ou MalG entière) fusionnée à la phosphatase alcaline (PhoA) grâce à l'utilisation d'outils de biologie moléculaire combinée à la bio-informatique.

2. Matériel et méthodes:

2-1. Milieu et conditions de culture

Toutes les cultures se font à 37°C en condition d'agitation constante sur milieu LB (Lauria Bertani).

Sept souches d'*E.coli* produisant chacune une protéine chimérique différentes sont utilisés. Chaque fusion traductionnelle malG-phoA est portée par un plasmide différent qui confère en outre la résistance à

l'ampicilline.

2-2. Prédiction *in silico* de la topologie de MalG

À l'aide de la séquence de la protéine MalG (P68183) obtenue sur le serveur UniprotKb et de son profil d'hydrophobicité selon l'échelle de Kyte et Doolittle calculé avec l'outil ProtScal (Gasteiger et al., 2005), différents modèles topologiques sont proposés indiquant l'orientation de la protéine dans la membrane plasmique et la localisation précise des segments transmembranaires putatifs dans la séquence primaire de MalG. Les prédictions sont comparées ensuite avec celle trouvée sur le serveur TMPRED (<http://expasy.org/>).

Prédiction *in silico* de la topologie de la maltoporine

À titre comparatif et dans l'optique de valider notre modèle de prédiction, nous avons en outre fait une prédiction *in silico* de la maltoporine aussi appelée LamB obtenus sur le serveur UniprotKb (P02943 · LAMB_ECOLI), qui est une protéine de la membrane externe d'*Escherichia coli* (souche K12), formant un pore spécifique aux maltodextrines. Notons aussi qu'elle est également le récepteur au phage λ (Chatterjee & Rothenberg, 2012) ; cette structure est disponible dans la Protein Databank (id #1MAL, <http://www.pdb.org/>).

Détermination *in vitro* de l'organisation topologique

Afin de déterminer l'organisation topologique de la protéine MalG, nous avons conçu et utilisé une fusion traductionnelle pour exprimer une protéine chimérique. Celle-ci contient une partie de la protéine MalG fusionnée avec PhoA. Ces différentes parties ont été choisies de sorte à être tronquées au niveau des segments transmembranaires d'après le modèle *in silico*. Sachant que PhoA n'est active que lorsqu'elle est dans le périplasmique, nous pourrions alors orienter facilement chaque segment (côté périplasmique ou cytoplasmique) en mesurant directement son activité à l'aide d'un substrat chromogène, le p-nitrophénylphosphate, (PNPP), et ainsi vérifier expérimentalement la topologie prédite *in silico* de la protéine. Le poids moléculaire théorique de chaque protéine chimérique est calculé grâce aux données du serveur expasy (<http://expasy.org/>).

2-3. Construction du plasmide pGA4

Nous avons utilisé différents outils de biologie moléculaire pour construire le plasmide pGA4 à partir du plasmide pGA7 ; ce qui permet l'expression de la protéine de fusion MalG entière avec PhoA. Nous avons supprimé une partie de ce plasmide pour obtenir le plasmide pGA4 avec MalG tronquée et fusionnée à PhoA (Dassa, 1990). Nous avons employé le logiciel pDRAW32 afin de valider cette tache *in silico* (figure 2). Une PCR en trois temps - PCR amont, aval et PCR3 - a été utilisée afin d'obtenir cette construction :

Melange PCR amont : H₂O : qsp 50 μ l ; tampon de réaction 5x :1x ; dNTP(5mM) 200 μ M ; oligo PGA7Xho 5 μ M : 0,5 μ M ; oligo del7/4-am 5 μ M : 0,5 μ M ; Taq polymérase 0,1u/ μ l : 0.1 u ; matrice : plasmide pGA7 1/100 : 5 u.

Melange PCR aval : H₂O : qsp 50 μ l ; tampon de réaction 5x :1x ; dNTP(5mM) 200 μ M ; oligo PGA7Xba 5 μ M : 0,5 μ M ; oligo del7/4-av 5 μ M : 0,5 μ M ; Taq polymérase 0,1u/ μ l : 0.1 u ; matrice : plasmide pGA7 1/100 : 5 u.

Melange PCR3 : H₂O : qsp 50 μ l ; tampon de réaction 5x :1x ; dNTP(5mM) 200 μ M ; PGA7Xba 5 μ M : 0,5 μ M ; PGA7Xba 5 μ M : 0,5 μ M ; Taq polymérase 0,1u/ μ l : 0.1 u ; matrice : pCR amont 2 μ l (1/20) + PCR aval 2 μ l (1/20).

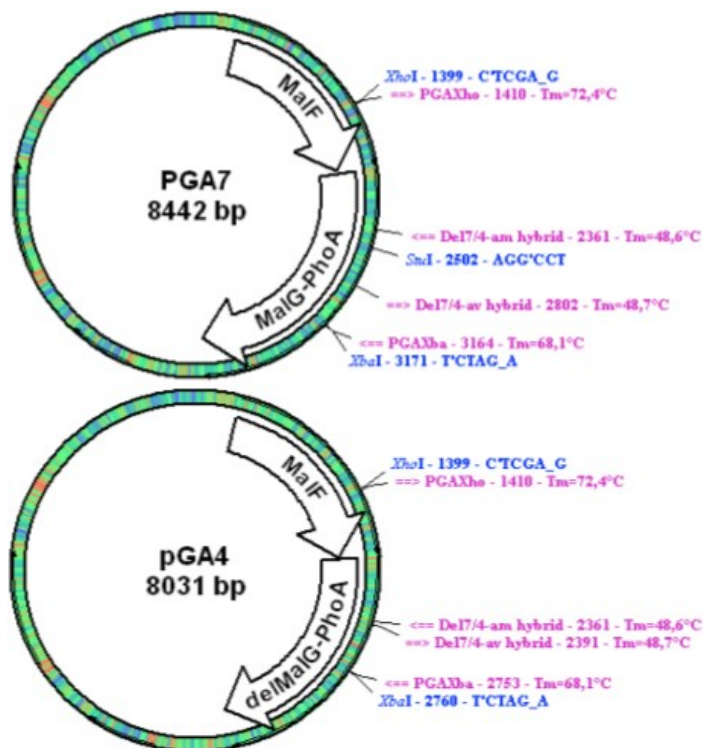


Fig. 2. Représentations graphiques des plasmides pGA7 et pGA4 obtenues avec le logiciel pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>).

Les différentes amorces utilisées pour la construction de pGA4 sont

Tab. 1. Séquence des oligonucléotides utilisés dans les différentes PCR

L'oligonucléotide	Séquence 5' → 3'
PGAXho	GTTGAGCGCGCTCGAGGGCGTG
PGAXba	CCCAGCGCGCCTCTAGAGTTTGG
DelI7/4-am	GTGTATAAGAGTCCGGGTGAGTATTCAGGCC
DelI7/4-av	GGCCTGAATACTACCCGGACTCTTATACAC
DelPCR	GCTTCCAGGCAAAGCGACG

détaillées dans le tableau 01.

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % (poids/volume) : pour 100 ml de gel à préparer, l'agarose est dissoute dans le tampon TAE 1X : Tris 40 mM, Acétate de sodium 5 mM, EDTA 2 mM pH 8., 3 µl de bromure d'éthidium (BET) sont rajouter pour la visualisation de l'ADN sous UV. Une fraction aliquote du produit à analyser est mélangée avec du tampon de charge (concentration finale bleu de bromophénol 0,02 % ; glycérol 3 % ; tampon TAE 1X). PCR : 10 µl ; plasmide PGA7 : 5 µl ; marqueur moléculaire 1 kb ladder (Promega) : 5 µl.

2-4. Transformation d'*E.coli* DH5α par électroporation

Des bactéries compétentes DH5α d'*E.coli* ont été transformé par électroporation avec 3 échantillons :

- Le produit de ligation (pGA7 + PCR3)
- Le produit de ligation ne contenant que pGA7
- Le plasmide pGA7 (20 ng)

Le volume final de bactéries transformées est de 870 µL. Nous avons étalé un certain volume de bactéries (indiqué dans le tableau ci-dessous) sur un milieu gélosé contenant du LB agar avec 100 µg/mL d'ampicilline. Pour la transformation A, nous avons rajouté du BCIP qui va nous permettre de distinguer les colonies ayant une activité phosphatase alcaline. En effet, les colonies n'ayant pas d'activité phosphatase alcaline seront blanches, alors que les colonies ayant intégré le plasmide pGA7, seront bleues, indiquant que la phosphatase alcaline est bien active. Le BCIP est alors hydrolysé par une phosphatase alcaline active ainsi les colonies deviennent bleues. (tableau 2)

Tab. 2. Transformation de la souche *E. coli* DH5α

	A	B	C
Échantillon utilisé pour la transformation	Produit ligation pGA7 + PCR3	Produit ligation pGA7	Plasmide pGA7 (20 ng)
Milieu LB agar	+ ampicilline + BCIP	+ ampicilline	+ ampicilline
50 µL de transformation	15 colonies bleues + environ 100 blanches	Environ 1000 colonies blanches	Colonies blanches incomptables
820 µL de Transformation étalé sur boîte	3 colonies bleues + colonies blanches incomptables	/	/

Analyse des transformants par PCR

Afin de vérifier si les transformants sélectionnés contiennent bien la protéine chimérique attendue, des PCR sur colonies avec les amorces delPCR et PGAXba ont été effectuées (György et al 2013): volume réactionnel final = 50µL. Nous attendons un fragment amplifié de 906 pb pour pGA7 et de 495 pb pour pGA4.

Le tube ne contenant que le plasmide pGA7 nous permet de vérifier la digestion du plasmide pGA7. L'obtention des colonies pour cette transformation suggèrera que le plasmide n'a pas été digéré par les 3 enzymes ou que le plasmide a été digéré partiellement et qu'il a pu se refermer sur lui-même (tableau 3).

Tab. 3. mixe pour l'analyse des transformants par PCR

	pGA7 + PCR3	pGA7
PCR3 digéré XhoI/XbaI et purifié	15 µL	/
pGA7 digéré XhoI/StuI/XbaI et purifié	8 µL	8 µL
Tampon ligase 10X	3 µL	3 µL
T4 DNA ligase	1 µL	1 µL
H ₂ O mQ	3 µL	18 µL

2-5. Dosage de l'activité de la Phosphatase alcaline :

Pour déterminer l'activité de la PhoA, chaque échantillon de 0,1 ml a été complété par 0,9 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8, 50 µl de chloroforme, et 50 µl de SDS 0,1%. Les réactions ont été initié par l'addition de 0,1 ml de solution 0,7% de PNPP incubées pendant 2 h à 28 °C, et arrêtées avec 0,1 ml de 1 M KH₂PO₄ ; suivie par une mesure de l'A420nm.(Boyd et al., 1993)

L'absorbance mesurée à 420nm correspond au nombre de mole de PNP libéré. L'activité de la phosphatase alcaline est la quantité de mole de produit formé par unité de temps*quantité de protéines.

$$\text{Activité} = A_{420 \text{ nm}} / (\text{temps} * A_{600 \text{ nm}})$$

3. Résultats & discussion

3-1. Prédiction *in silico* de la topologie de MalG

le profil dans La [figure 3](#) représente l'hydrophatie moyenne le long de la séquence d'acides aminés de la protéine MalG déterminé d'après l'échelle de Kyte et Doolittle ([Gasteiger et al., 2005](#)) avec une fenêtre glissante de 19 résidus :

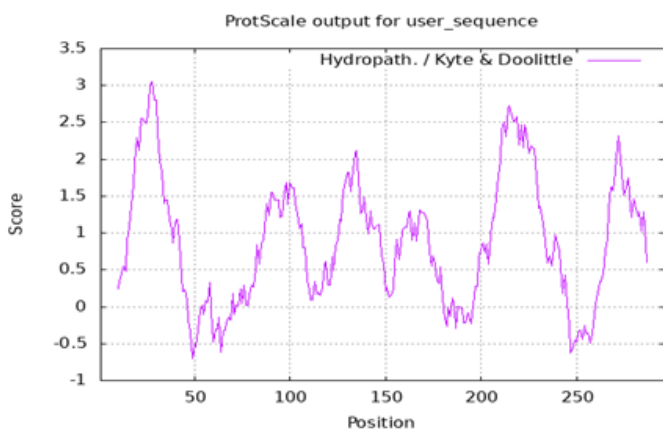


Fig. 3. Profil d'hydrophobicité de la protéine MalG obtenus à l'aide de l'outil ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>)

Nous pouvons ainsi dégager six zones hydrophobes de plus de 20 acides aminés pouvant correspondre probablement à six hélices transmembranaires. Dans la [figure 4](#) une représentation des deux topologies que nous pouvons prédire à partir de ce profil ; les numéros des acides aminés de part et d'autre de la membrane sont approximatifs car l'échelle disponible sur le profil ne permet pas de les déterminer précisément le positionnement de la partie N-terminale .

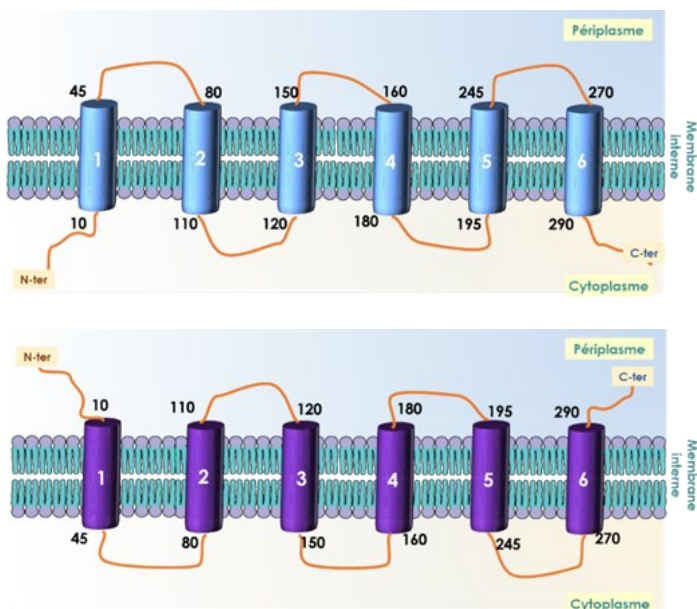


Fig. 4. Modèle 1 (haut) et 2 (bas) de topologie prédit à partir du profil d'hydrophobicité

En consultant la base de données Uniprotkb, nous pouvons avoir une idée plus précise de la topologie de MalG. En effet d'après les données de cristallographies, la maltoporine a bien six segments transmembranaires comme proposés à partir des profils hydrophobes. Grâce

à ces données, nous avons déterminé précisément le numéro des acides aminés de part et d'autre des hélices transmembranaires. ([Figure 5](#))

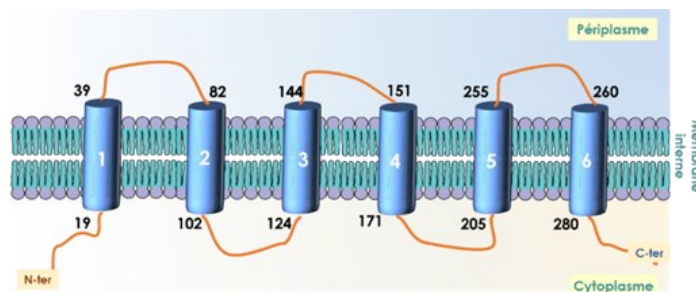


Fig. 5. Modèle 3 de topologie prédit à partir de UniprotKb

3-2. Prédiction *in silico* de la topologie de la maltoporine

Nous savons que la maltoporine aussi appelée LambB, qui est une protéine de la membrane externe des bactéries, forme un pore spécifique aux maltodextrines et est aussi le récepteur au phage λ ([Bertozi Silva, Storms, & Sauvageau, 2016](#); [Chatterjee & Rothenberg, 2012](#)).

D'après le profil de la [figure 6](#) nous pouvons alors noter une zone hydrophobe unique allant approximativement de l'acide aminé n°1 à l'acide aminé n°30. Cette zone pourrait être une hélice α correspondant au peptide signal de la protéine ; En dehors de cette région, il n'y a pas d'autres zones hydrophobes de plus de 20 acides aminés détectables sur le profil. Ce qui nous permet de conclure que la maltoporine ne contient pas d'hélices α .

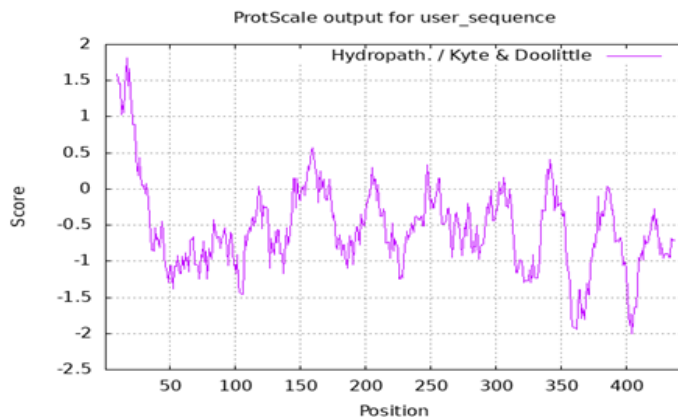


Fig. 6. Le profil d'hydrophobicité de la protéine maltoporine déterminé d'après l'échelle de Kyte et Doolittle avec une fenêtre de 19 résidus

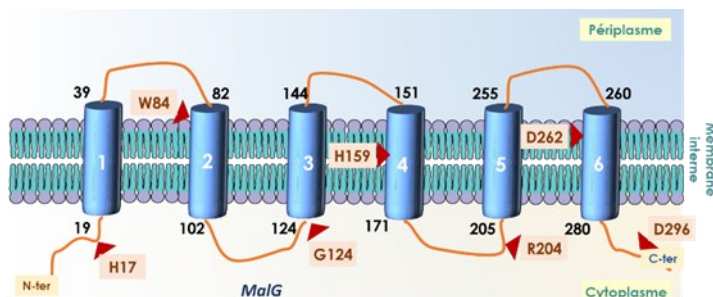
Cette protéine membranaire est donc formée uniquement de feuillets β , résultat en concordance avec la littérature ([Andrews & Fields, 2020](#); [Baldwin, Bhatia, & Luckey, 2011](#); [Charbit, 2003](#); [Thoma et al., 2017](#)).

3-3. Localisation des différents points de fusion :

Le [tableau 4](#) ci-dessous indique le point de fusion entre une partie de MalG et PhoA entière utilisé dans cette étude. Le dernier résidu de MalG présent dans la fusion est ainsi indiqué. Un modèle représentatif d'une fusion est montré dans la [figure 7](#).

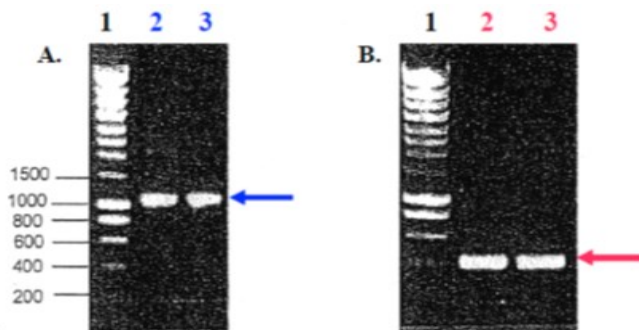
Tab. 4. correspondance plasmide et point de fusion entre une partie de MalG et PhoA

Plasmide	pGA1	pGA2	pGA3	pGA4	pGA5	pGA6	pGA7
Dernier résidu de MalG	H17	W84	G124	H159	R204	D262	G296
Poids moléculaire (kDa)	50,47	57,93	62,09	66,09	70,92	77,27	80,71

**Fig. 7.** Modèle 3 de topologie indiquant en rouge les derniers acides aminés de MalG des différentes protéines chimériques.

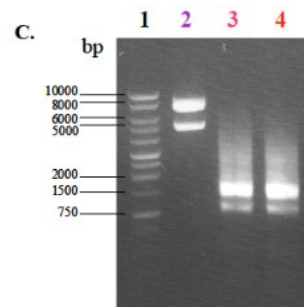
3-4. Construction du plasmide pGA4

Nous avons effectué trois réactions de PCR pour la PCR en 3 temps. Les deux premières réactions de PCR appelées "PCR amont" et "PCR aval" ont été effectuées en parallèle (résultat indiqué dans la figure 08).

**Fig. 8.** gel d'agarose 0,8% (TAE), (A) dans les puits 2 et 3 les produits amplifiés lors de la "PCR amont" (10 µL sur 50 µL de mélange réactionnel total). (B) dans les puits 2 et 3 les produits amplifiés lors de la "PCR aval" (10 µL sur 50 µL de mélange réactionnel total).

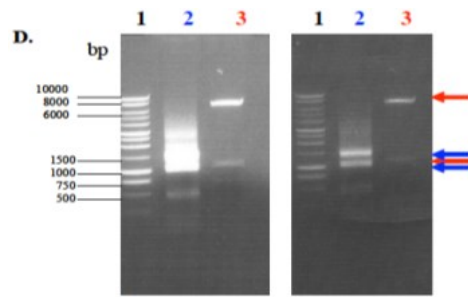
- PCR amont : La matrice utilisée est le plasmide pGA7 et les amorces sont PGA7Xho et del7/4-Am. Nous attendons un fragment amplifié de 1002 pb (flèche bleue). Nous observons sur la figure A une bande correspondant à la taille attendue avec une forte intensité.
- PCR aval : La matrice utilisée est le plasmide pGA7 et les amorces sont PGA7Xba et del7/4-Av. Nous attendons des fragments amplifiés de 415 pb (flèche rouge). Nous observons sur la figure B une bande correspondant à la taille attendue avec une forte intensité.
- 3^{ème} PCR Nous avons effectué cette 3^{ème} PCR en utilisant comme matrice un mélange contenant l'ADN amplifié lors de la PCR amont et celui amplifié lors de PCR aval en quantité égale. Les amorces utilisées sont PGA7Xho et PGA7Xba. Nous attendons un

fragment amplifié de 1376 pb. Les résultats de la 3^{ème} PCR sont représentés sur la figure 8C.

**Fig. 8C.** puit 1 : plasmide pGA7 ; puits 2 et 3 : les produits amplifiés lors de la 3^{ème} PCR (10 µL sur 50 µL de mélange réactionnel total).

Dans le puit 1, nous avons 2 bandes d'une taille d'environ 5500 pb et d'environ 7000 pb. Ces bandes correspondent à deux formes différentes de l'ADN plasmidique de pGA7 qu'on peut qualifier de superenroulée et de relâchée. Dans les puits 3 et 4, nous observons une bande de forte intensité, majoritaire à la taille attendue de 1376 pb. Nous pouvons aussi observer en plus deux bandes de plus faible intensité migrant à des tailles de 1002 et 415 pb pouvant correspondre aux ADN matrices utilisés (PCR amont et aval).

Digestion enzymatique de l'insert (produit de la 3^{ème} PCR) et du vecteur Le produit amplifié lors de la 3^{ème} PCR (= PCR3) a été digéré par XhoI et XbaI. Le plasmide pGA7 a été digéré par XhoI / XbaI et StuI.

**Fig. 8D.** puit 2 : échantillon de la double digestion de PCR3 ; puit 3 : échantillon de la triple digestion de pGA7.

Pour la double digestion de PCR3 par XhoI et XbaI, nous attendons 1 bande de 1357 pb (figure 8D). Nous observons 3 bandes : une correspondant au fragment de digestion et les autres aux fragments (1002 et 415 pb) pouvant appartenir aux ADN matrices utilisés (PCR amont et aval) et déjà visualisé sur la figure C.

Concernant la triple digestion de PCR3 par XhoI / XbaI et StuI, nous attendons 3 bandes à 6670 pb / 1103 pb et 669 pb. Nous observons sur le gel la bande à 6670 pb et une autre à 1103 pb. La quantité déposée sur gel ne nous permet pas de visualiser la bande à 669 pb.

Analyse des transformants par PCR

Les PCR concernant les transformations sont indiquées dans la figure 9 ; dans le puit 4 (témoin), nous observons une bande correspondant à 906 pb qui concerne le fragment amplifié à partir de pGA7. Dans le puit 1, la bande semble migrer à une taille supérieure à 1000 pb. Cette colonie blanche ampr ne semble pas contenir pGA7. Dans le puit 3, nous avons bien un fragment de 495 pb correspondant au

fragment amplifié à partir de pGA4. Les bactéries de cette colonie ont bien intégré pGA4.

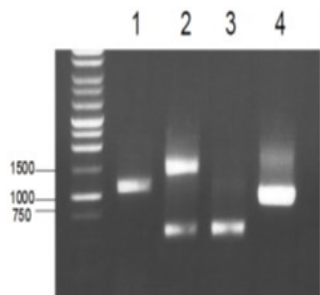


Fig. 9. gel d'agarose 0,8% (TAE),
 puit 1 : un échantillon (10 μ L/50) de la PCR sur une colonie blanche,
 puit 2 : un échantillon (10 μ L/50) de la PCR sur une colonie bleue.
 puit 3 : un échantillon (10 μ L/50) de la PCR sur une colonie bleue.
 puit 4 : témoin = un échantillon (10 μ L/50) de la PCR sur pGA7

Dans le puit 2, nous obtenons la même bande que dans le puit 3 mais avec une bande supplémentaire migrant à environ 1500 pb. Pour la suite des expériences, nous avons sélectionné la colonie bleue utilisée dans le puit 3.

Analyse qualitative et quantitative de l'activité de la phosphatase alcaline dans les différentes protéines chimériques

Nous avons donc à disposition 7 souches bactériennes contenant les différents plasmides (pGA1 à pGA7); Et donc pouvons déterminer qualitativement si les protéines chimériques (pGA1 à pGA7) exprimées dans la souche DH5a d'E.coli sont actives ou non. Les colonies correspondant à chaque construction chimérique ont été étalées sur boîte de Pétri contenant de l'ampicilline et du BCIP. Les résultats sont indiqués dans le tableau 04 ci-dessous.

Pour la construction pGA6 la coloration bleue est apparue beaucoup plus vite que les autres et l'intensité finale est plus forte. Ce qui indique que cette construction a une forte activité phosphatase alcaline.

Afin de déterminer quantitativement l'activité de la phosphatase alcaline dans chaque construction, nous avons effectué un dosage de l'activité phosphatase alcaline avec ajout de paranitrophénol phosphate (PNPP). Nous avons mesuré l'absorbance à 420 nm et noté l'absorbance dans le tableau ci-dessous. La mesure faite à 600 nm correspond à la turbidité de la suspension bactérienne, c'est une mesure indirecte de la quantité de protéines bactériennes.

Tab. 5. Résultats de l'activité PhoA par le test BCIP

	A600 nm	A420 nm	Activité (min^{-1})	Couleur colonies (BCIP)
<i>pTRC 1.1</i>	0,86	0	0	-
<i>pGA1.1</i>	0,75	0,002	5,93E-05	blanc
<i>pGA2.1</i>	1,07	0,154	3,20E-03	bleu
<i>pGA3.1</i>	0,8	0,011	3,06E-04	blanc
<i>pGA4.1</i>	0,92	0,074	1,79E-03	bleu
<i>pGA5.1</i>	1,54	0,117	1,69E-03	blanc
<i>pGA6.1</i>	0,79	0,504	1,42E-02	bleu
<i>pGA7.1</i>	0,88	0,025	6,31E-04	blanc
<i>pGA4*</i>	1,04	0,682	1,46E-02	bleu

La protéine PhoA a la particularité de posséder 4 ponts disulfure intramoléculeaires dont la formation est dépendante de la présence de Dsb (disulfide bond proteins) dans le périplasma où les conditions sont oxydatives. Ces ponts disulfures sont essentiels à l'activité de l'enzyme (Denoncin & Collet, 2013; Schlegel, Hjelm, Baumgarten, Vikström, & de Gier, 2014). Quand PhoA est localisé au niveau du cytoplasme, elle ne sera pas active vu que les ponts disulfures ne seront pas formés alors que lorsqu'elle est dans le périplasma, elle est bien active (Katzen & Beckwith, 2002).

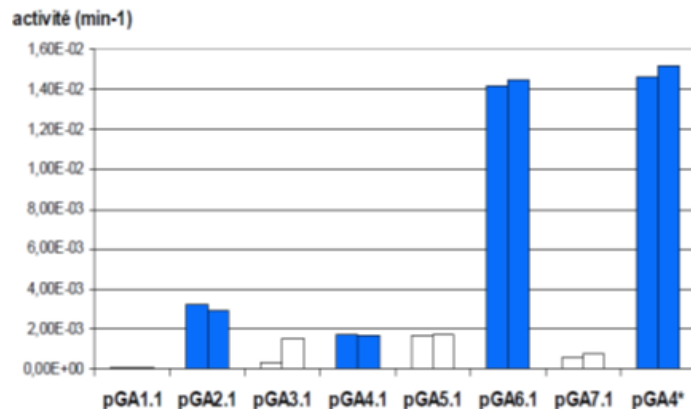


Fig. 10. Activité de la phosphatase alcaline dans les différentes protéines chimériques

Dans le graphe (figure 10) ci-dessous, nous avons reporté l'activité en fonction de chaque construction (fait en double) et nous avons représenté en bleu les barres correspondant aux colonies bleues avec le test BCIP et en blanc, celles correspondant aux colonies blanches.

Pour pGA4* et pGA6.1, nous avons une activité de la phosphatase alcaline supérieure à $1,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Les deux constructions apparaissent bien bleues dans le test BCIP, nous pouvons alors dire que la phosphatase alcaline se trouve dans le périplasma dans ce cas de figure. En ce qui concerne pGA4.1, nous remarquons une très faible activité (inférieure à $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) bien que les colonies soient bleues. Cependant pour la construction pGA4* la phosphatase alcaline est quasi 10 fois plus active (supérieure $1,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

Par contre pGA2.1 et pGA4.1, les colonies sont bien bleues avec le BCIP, mais l'activité obtenue avec le test PNPP est très faible; Les valeurs d'activité sont proches de celles de pGA3.1 et de pGA5.1 qui n'ont pas d'activité phosphatase alcaline (colonies sont blanches). Pour ces deux constructions, nous avons une activité de l'ordre du bruit de fond (tableau 6).

Tab. 6. Résultats tests BCIP/PNPP

Construction	BCIP	PNPP	Localisation de PhoA
<i>pGA1.1</i>	-	-	cytoplasme
<i>pGA2.1</i>	+	?	périplasma
<i>pGA3.1</i>	-	?	cytoplasme
<i>pGA4*</i>	+	++	périplasma
<i>pGA5.1</i>	-	-	cytoplasme
<i>pGA6.1</i>	+	++	périplasma
<i>pGA7.1</i>	-	-	cytoplasme

Les fusions (pGA2.1, pGA4* et pGA6.1) ont leurs parties PhoA situées dans le périplasma, cependant n'ont pas la même activité. Nous avons remarqué qu'il y avait un problème de seuil de sensibilité

du test d'activité avec le PNPP (tableau 6) pour pouvoir conclure concernant toutes les constructions des protéines chimériques. Le test d'activité chromogène BCIP est plus sensible et nous permet donc de conclure quant à la localisation de PhoA dans toutes les constructions de protéines chimériques. Nous retrouvons ainsi le modèle 3 prédit au préalable (figure 11).

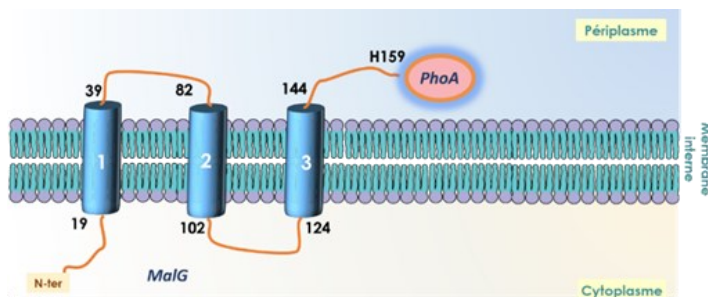


Fig. 11. Représentation schématique de l'une des protéines chimères (Δ MalG-PhoA) exprimée par le plasmide pGA4

4. Conclusion

Nous avons pu déterminer l'organisation topologique de la protéine MalG dans la membrane en étudiant d'une part l'activité de protéines chimères comportant une partie de MalG (ou MalG entière) fusionnée à la phosphatase alcaline (PhoA) et d'autre part en alliant les prédictions in silico. Cependant nos résultats montrent que l'expression des protéines chimères peut être très variables et il est important d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

Néanmoins nous pouvons d'ores et déjà conclure que globalement, MalG possède 6 segments transmembranaires dénombrant 296 résidus d'acides aminés, et des régions C-terminale et N-terminal hydrophiles localisées au niveau cytoplasmique.

Références

- Andrews, B., & Fields, S. (2020). Distinct patterns of mutational sensitivity for λ resistance and maltodextrin transport in *Escherichia coli* LamB. *Microbial genomics*, 6(4).
- Baldwin, V., Bhatia, M., & Luckey, M. (2011). Folding studies of purified LamB protein, the maltoporin from the *Escherichia coli* outer membrane: trimer dissociation can be separated from unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(9), 2206-2213.
- Bertozi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*, 363(4), fnw002.
- Boos, W., & Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 204-229.
- Bordignon, E., Grote, M., & Schneider, E. (2010). The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century—towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Molecular microbiology*, 77(6), 1354-1366.
- Boyd, D., Traxler, B., & Beckwith, J. (1993). Analysis of the topology of a membrane protein by using a minimum number of alkaline phosphatase fusions. *Journal of bacteriology*, 175(2), 553-556. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.553-556.1993>
- Charbit, A. (2003). Maltodextrin transport through lamB. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 8(6), 265-274.
- Chatterjee, S., & Rothenberg, E. (2012). Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses*, 4(11), 3162-3178.
- Chen, J. (2013). Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Current opinion in structural biology*, 23(4), 492-498.
- Dassa E. (1990). Cellular localization of the MalG protein from the maltose transport system in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*. Jun;222(1):33-6. doi: 10.1007/BF00283019. PMID: 2233678.
- Denoncin, K., & Collet, J.-F. (2013). Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxidants & redox signaling*, 19(1), 63-71.
- Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M., & Schneider, E. (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS microbiology reviews*, 35(1), 3-67.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
- Goffeau, A., De Hertogh, B., & Baret, P. (2004). ABC transporters.
- György, H., József, K., Mihály, K., András, M. C., László, N., Gábor, P., & István, V. (2013). Introduction to Practical Biochemistry.
- Hiller, R.M., von Kügelgen, J., Bao, H., Duong Van Hoa F & Cytrynbaum E N. (2020). A Mathematical Model for the Kinetics of the Mal-FGK22 Maltose Transporter. *Bull Math Biol* 82, 62. <https://doi.org/10.1007/s11538-020-00737-8>
- Holland, I. B. (2011). ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. *Essays Biochem*, 50(1), 1-17. doi:10.1042/bse0500001
- Jacobo-Albavera, L., Domínguez-Pérez, M., Medina-Leyte, D. J., González-Garrido, A., & Villarreal-Molina, T. (2021). The role of the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) in human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1593.
- Katzen, F., & Beckwith, J. (2002). [7] Disulfide bond formation in periplasm of *Escherichia coli*. In *Methods in enzymology* (Vol. 348, pp. 54-66): Elsevier.
- Locher, K. P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature structural & molecular biology*, 23(6), 487-493.
- Oldham, M. L., Chen, S., & Chen, J. (2013). Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18132-18137. <https://doi.org/10.1073/pnas.13114071>
- Oldham, M. L., & Chen, J. (2011). Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15152-15156.
- Orelle, C., Oldham, M. L., & Davidson, A. L. (2014). The maltose ABC transporter: where structure meets function. In *Membrane transport mechanism* (pp. 181-205): Springer.
- Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(3), 218-227.
- Rice, A. J., Park, A., & Pinkett, H. W. (2014). Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(5), 426-437.
- Schlegel, S., Hjelm, A., Baumgarten, T., Vikström, D., & de Gier, J.-W. (2014). Bacterial-based membrane protein production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1739-1749.
- ter Beek, J., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *Journal of General Physiology*, 143(4), 419-435.

- Thoma, J., Ritzmann, N., Wolf, D., Mulvihill, E., Hiller, S., & Müller, D. J. (2017). Maltoporin LamB unfolds β hairpins along mechanical stress-dependent unfolding pathways. *Structure*, 25(7), 1139-1144. e1132.
- Wang, J. Q., Wu, Z. X., Yang, Y., Teng, Q. X., Li, Y. D., Lei, Z. N., . . . Chen, Z. S. (2021). ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent updates. *Journal of Evidence-Based Medicine*, 14(3), 232-256.
- Wu, Z.-X., Yang, Y., Wang, J.-Q., Zhou, W.-M., Chen, J., Fu, Y.-G., . . . Zhang, J.-Y. (2021). Elevated ABCB1 expression confers acquired resistance to aurora kinase inhibitor GSK-1070916 in cancer cells. *Frontiers in pharmacology*, 11, 615824.