

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

# **ANALYSE DU MÉCANISME FONCTIONNEL DE LA CHAPERONE/INSERTASE TAMA IMPLIQUÉE DANS LE REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES**

Par  
Michel Lê

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences de Maîtrise en microbiologie appliquée de l'INRS

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
Examineur interne

Nicolas Doucet  
INRS – Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Steve Bourgault  
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Charles Calmettes  
INRS – Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie



## RÉSUMÉ

---

Le module de translocation et d'assemblage (TAM) participe au repliement des protéines de la membrane externe (OMPs) chez les bactéries Gram négatives. Malgré plus d'une décennie de travaux depuis sa découverte, son mécanisme reste inconnu. La modélisation moléculaire a identifié deux arginines dans la porte latérale de la sous-unité TamA comme étant des sites d'interactions aux phospholipides conservés. Ces arginines empêcheraient les lipides d'entrer dans le tonneau et contribueraient à l'activité insertase de la protéine. Ici, un modèle de protéoliposome a été utilisé pour mesurer l'influence de TamA sur le repliement des OMPs. Les tests d'activité insertase ont montré que l'intégration de TamA dans le liposome ne catalyse pas l'assemblage et l'insertion d'OmpX dans la bicouche lipidique. Cela pourrait être dû au fait que l'OmpX ne fait pas partie des substrats de TamA ou que TamA a besoin de sa protéine partenaire TamB pour fonctionner. En outre, des cristaux de TamA avec des substrats lipidiques PG14 ou Lyso PG14 ont été produits pour valider l'interaction des arginines conservées avec des lipides. Aucun cristal obtenu par co-cristallisation n'a fourni de données suffisantes pour résoudre la structure, vraisemblablement parce que les lipides entravent la nucléation et la croissance des cristaux de TamA.

Mots-clés : *P. aeruginosa*; TamA; protéines de la membrane externe; cristallographie; activité insertase; co-cristallisation



## ABSTRACT

---

The translocation and assembly module (TAM) participates in the folding of outer membrane proteins (OMPs) in Gram negative bacteria. Despite over a decade of work since its discovery, its mechanism remains unknown. Molecular modelling identified two arginines in lateral gate of the TamA subunit as conserved phospholipid interactions sites. These arginines would prevent lipids from entering the barrel and contribute to the insertase activity of the protein. Here, a proteoliposome model was used to measure how TamA influences OMP folding. Insertase activity tests revealed that integrating TamA into the liposome doesn't catalyse the assembly and insertion of OmpX into the lipid bilayer. This could be due to OmpX not being one of TamA's substrate or to TamA needing its partner protein TamB in order to function. Furthermore, TamA crystals with lipids substrates PG14 or Lyso PG14 were produced to assess the interaction of the conserved arginines with lipids. No crystals obtained from co-crystallisation method yielded sufficient diffraction data to resolve a crystal structure likely due to lipids impeding TamA crystal nucleation and growth.

Keywords: *P. aeruginosa*; TamA; outer membrane proteins; crystallography; insertase activity; co-crystallisation



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 LES ANTIBIOTIQUES .....	1
1.1.1 <i>L'importance des antibiotiques pour la santé mondiale</i> .....	1
1.1.2 <i>Les modes d'actions des antibiotiques</i> .....	1
1.1.3 <i>L'âge d'or des antibiotiques</i> .....	2
1.1.4 <i>Les dangers de la résistance croissante aux antibiotiques</i> .....	2
1.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	3
1.2.1 <i>La résistance intrinsèque de Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
1.2.2 <i>La résistance acquise de Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.2.3 <i>La résistance adaptative de Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.3 DÉVELOPPEMENT D'ANTIBIOTIQUES NOUVEAUX ET INNOVATEURS CONTRE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	7
1.4 LA BIOSYNTHÈSE DES OMPs COMME CIBLE POTENTIELLE DES ANTI-INFECTIEUX .....	8
1.5 BIOSYNTHÈSE DES OMPs.....	9
1.6 LES CHAPERONNES SURA, SKP ET DEGP .....	10
1.7 LA MACHINERIE D'ASSEMBLAGE DE TONNEAUX BÊTA (BAM).....	10
1.7.1 <i>BamA</i> .....	11
1.7.2 <i>BamB</i> .....	12
1.7.3 <i>BamC</i> .....	13
1.7.4 <i>BamD</i> .....	13
1.7.5 <i>BamE</i> .....	13
1.8 LES DEUX PRINCIPALES THÉORIES DU MÉCANISME DE BAMA .....	13
1.8.1 <i>Premier modèle : la porte latérale de BamA sert de modèle</i> .....	16
1.8.2 <i>Deuxième modèle : la porte latérale de BamA perturbe la membrane</i> .....	16
1.8.3 <i>Aperçu du mécanisme à partir de la cryomicroscopie électronique</i> .....	17
1.9 LE MODULE DE TRANSLOCATION ET D'ASSEMBLAGE (TAM) .....	17
1.9.1 <i>TamA</i> .....	19
1.9.2 <i>TamB</i> .....	20

1.10	ÉVOLUTION DU COMPLEXE TAM .....	21
1.11	LE MÉCANISME DU COMPLEXE TAM.....	22
1.12	LES INTERACTIONS POSSIBLES ENTRE BAM ET TAM.....	23
1.13	MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE LA PORTE LATÉRALE DE TAMA .....	24
1.14	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	25
<b>2</b>	<b>METHODOLOGIE .....</b>	<b>26</b>
2.1	MESURE DE L'ACTIVITÉ INSERTASE DE TAMA ET DE SES MUTANTS DANS UN MODÈLE DE PROTÉOLIPOSOME .....	26
2.2	PRODUCTIONS DE TAMA MUTANTES PAR CLONAGE RF .....	26
2.3	PRODUCTION ET PURIFICATION DE TAMA ET DE SES MUTANTS .....	27
2.4	PURIFICATION DES OMPs SUBSTRATS.....	28
2.5	PRÉPARATION DES LIPOSOMES.....	28
2.6	TEST D'ACTIVITÉ INSERTASE.....	29
2.7	ORIENTATION DE LA PROTÉINE DANS LE LIPOSOME .....	30
2.8	CRISTALLOGRAPHIE DE TAMA AVEC DES SUBSTRATS LIPIDIQUES .....	30
2.9	CO-CRISTALLISATION.....	32
2.10	DÉTERMINATION DU RAPPORT LIPIDE/DÉTERGENT MAXIMALE DANS LES MICELLES MIXTES.....	33
2.11	TREMPAGE DE CRISTAUX .....	33
<b>3</b>	<b>MATERIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>35</b>
3.1	PCR.....	35
3.2	MILIEUX DE CULTURE .....	36
3.3	TRANSFORMATION.....	36
3.4	ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.....	37
3.5	TEST D'EXPRESSION DE BAMA DANS DIFFÉRENTES CELLULES COMPÉTENTES .....	37
3.6	ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL SDS-PAGE .....	37
3.7	WESTERN BLOT .....	37
3.8	PRODUCTION ET PURIFICATION DE TAMA ET DE SES MUTANTS .....	38
3.9	PRODUCTION ET PURIFICATION DE OMPX.....	38
3.10	PRÉPARATION DES LIPOSOMES.....	39
3.11	TEST DE L'ACTIVITÉ INSERTASE .....	39
3.12	DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ MINIMALE DE DÉTERGENT NÉCESSAIRE À L'INCORPORATION DU PG14 DANS LES MICELLES MIXTES .....	40
3.13	CRISTALLISATION DE TAMA.....	40
3.14	CO-CRISTALLISATION OF TAMA .....	41
<b>4</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>42</b>
4.1	MESURE DE L'ACTIVITÉ INSERTASE DE TAMA ET DE SES MUTANTS.....	42

4.2	CLONAGE DE BAMA.....	45
4.3	VÉRIFICATION DES ANCIENNES CONDITIONS DE CRISTALLISATION DE TAMA .....	47
4.4	CROISSANCE DE TAMA EN PRÉSENCE DE GLYCÉROL .....	48
4.5	CO-CRISTALLISATION DE TAMA AVEC PG14 ET LYSO PG14 .....	49
4.6	OPTIMISATION DES CRISTAUX DE TAMA NATIF POUR LE TREMPAGE DE CRISTAUX .....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>69</b>
8.1	PURIFICATION DE TAMA.....	69
8.2	GELS SDS-PAGE DES TESTS D'ACTIVITÉ INSERTASE DE OMPX DANS DES LIPOSOMES DE COMPOSITION LIPIDIQUES DIFFÉRENTES .....	71
8.3	CONTRIBUTION À UN MANUSCRIT EN PRÉPARATION.....	72



## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1.1 : Classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par différents organismes.	4
Figure 1.2 : Biogenèse des protéines de la membrane externe.	9
Figure 1.3 : Structures de chaque sous-unité du complexe BAM.	11
Figure 1.4 : Mécanismes hypothétiques du complexe BAM.	15
Figure 1.5 : Mécanisme proposé pour le complexe BAM.	17
Figure 1.6 : Structure du complexe TAM.	19
Figure 1.7 : Alignement structurel de BamA et TamA.	22
Figure 1.8 : Mécanisme proposé pour le complexe TAM.	23
Figure 1.9 : Simulation de dynamique moléculaire de TamA avec un lipide.	24
Figure 1.10 : Alignement des séquences de TamA de diverses espèces de <i>Pseudomonas</i> .	25
Figure 2.1 : Structures du lipide PC10.	29
Figure 2.2 : Structures du lipide PE10.	29
Figure 2.3 : Diagramme de phase d'une expérience de cristallisation de protéines.	31
Figure 2.4 : Structure de PG14.	32
Figure 2.5 : Structure de Lyso PG14.	33
Figure 4.1 : Taux de repliement d'OmpX dans des liposomes 100% PC10 avec et sans TamA.	43
Figure 4.2: Taux de repliement d'OmpX dans des liposomes 80% PC10 + 20% PE10 avec et sans TamA.	44
Figure 4.3 : Extraction du gène de BamA.	45
Figure 4.4 : Test d'expression de BamA.	47
Figure 4.5 : Cristallisation et diffraction des cristaux natifs de TamA.	48
Figure 4.6 : Cristallisation de TamA avec 4% glycérol.	49
Figure 4.7 : Absorbance de la solution PG14 en fonction de la quantité de C8E4 ajoutée.	50
Figure 4.8: Cristallisation et diffraction de TamA incubé avec des micelles mixtes de C8E4 et PG14 (10 :1).	51
Figure 4.9 : Optimisation de la taille des cristaux de TamA natif.	53
Figure 8.1 : Purification de TamA.	70
Figure 8.2 : Repliement intrinsèque et catalysé par Tama de OmpX dans des liposomes PC10.	71
Figure 8.3 : Repliement intrinsèque et catalysé par Tama de OmpX dans des liposomes 80% PC10 + 20% PE10.	72



## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 3.1 : Amorces utilisé dans cette étude

35



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BAM : machinerie d'assemblage des tonneaux bêta

*E. coli* : *Escherichia coli*

ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces *Enterobacter*

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

MCE : Esters de cellulose mélangés

OD600 : densité optique mesurée à une longueur d'onde de 600 nm

OMP : protéine de la membrane externe

OMS : Organisation mondiale de la santé

PC10 : 1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PE10 : 1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

PG14 : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

Lyso PG14 : 1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

PCR : réaction en chaîne par polymérase

TAM : module de translocation et d'assemblage

# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Les antibiotiques

### 1.1.1 L'importance des antibiotiques pour la santé mondiale

Les maladies infectieuses telles que la variole, le choléra, la pneumonie, la fièvre typhoïde, la tuberculose, et la syphilis ont historiquement été responsables pour des taux élevés de morbidité et de mortalité au sein de la population mondiale (Adedeji, 2016; Rouvière *et al.*, 1996). Ces maladies sont causées par des micro-organismes pathogènes tels que des bactéries, des virus, des parasites et des champignons. Elles peuvent se propager à travers l'environnement, se transmettre d'une personne à l'autre ou même être transmises par des insectes ou d'autres animaux. L'avènement des antibiotiques, qui a débuté par l'utilisation de salvarsan en 1910 pour traiter *Terponema pallidum*, la bactérie responsable de la syphilis, a constitué une avancée révolutionnaire dans la lutte contre les maladies infectieuses. Au point que l'espérance de vie de l'humanité a augmenté de 23 ans au cours des 100 prochaines années. Les antibiotiques sont des composés tirés de la nature, où les microbes produisent parfois des molécules pour tuer d'autres microorganismes qui leur disputent l'environnement, ou d'origine synthétique (Hutchings *et al.*, 2019).

### 1.1.2 Les modes d'actions des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent inhiber la croissance bactérienne ou éliminer les microbes en interférant avec une multitude de voies cellulaires telles que la synthèse de la paroi cellulaire, l'expression des protéines et la réplication de l'ADN. Certains antibiotiques agissent sur la biosynthèse de la paroi cellulaire en ciblant les protéines de liaison à la pénicilline, des enzymes qui participent à la synthèse du peptidoglycane. Le peptidoglycane est un composant essentiel de l'enveloppe cellulaire bactérienne qui aide la cellule à résister à la pression de turgescence et à maintenir sa morphologie. D'autres antibiotiques interviennent dans la biosynthèse des protéines en ciblant le ribosome, le complexe responsable pour la traduction de l'ARN messager en protéines. Les antibiotiques peuvent interférer avec le ribosome bactérien en ciblant l'une ou l'autre de ses sous-unités, 30S et 50S. Ils peuvent empêcher la liaison de l'ARN messager au ribosome, provoquer une erreur de lecture de la séquence à traduire et induire une fin prématurée de la traduction de l'ARN messager. Enfin, certains antibiotiques interfèrent avec la réplication de l'ADN en ciblant l'ADN gyrase bactérienne. Cette enzyme entaille l'ADN double brin et introduit

des super enroulements négatifs, ce qui est important car un super enroulement positif excessif lorsque les brins se séparent empêche la réplication et la transcription. Les antibiotiques peuvent également cibler plusieurs étapes du métabolisme de l'acide folique, un nutriment essentiel pour la synthèse des acides aminés et des acides nucléiques (Hutchings *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2017).

### **1.1.3 L'âge d'or des antibiotiques**

La pénicilline, peut-être l'antibiotique le plus connu, a été découverte par Alexander Fleming en 1928 sur une boîte de Pétri contaminée. Cette découverte, ainsi que celle de plusieurs autres antibiotiques, a conduit Selman Waksman à entreprendre une étude systématique des divers composés antimicrobiens produits par les micro-organismes. Waksman a identifié que les actinomycètes vivant dans le sol, en particulier le genre *Streptomyces*, sont des producteurs prolifiques de molécules qui présentent des propriétés antibiotiques contre les bactéries, les champignons, les virus, les nématodes et les insectes. Ces composés ont depuis été développés comme médicaments contre le cancer et comme immunosuppresseurs. Les travaux de Waksman ont marqué le début de ce qui est considéré comme l'âge d'or des antibiotiques. Cette période, qui a duré des années 1940 aux années 1960, a été marquée par la découverte rapide de nouvelles classes d'antibiotiques grâce à la facilité avec laquelle on pouvait les trouver (Adedeji, 2016; Hutchings *et al.*, 2019).

### **1.1.4 Les dangers de la résistance croissante aux antibiotiques**

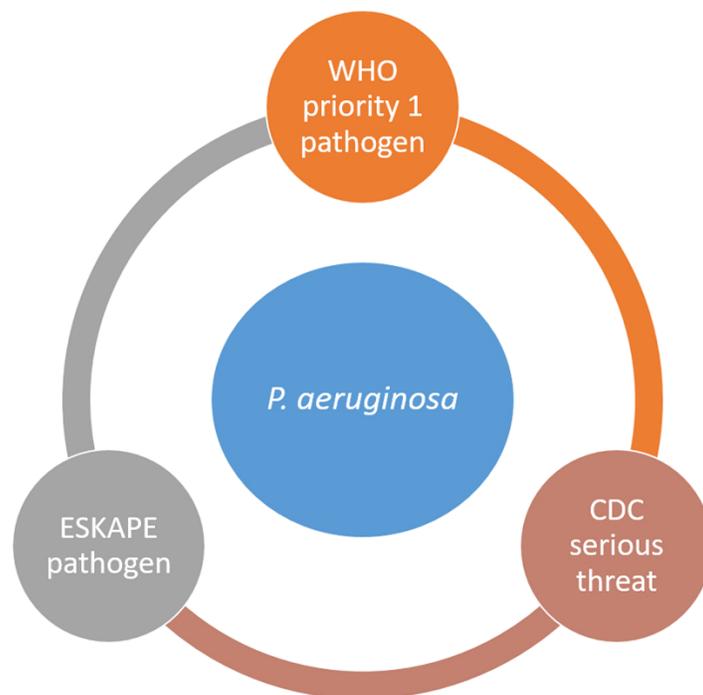
La plupart de ces antibiotiques sont encore utilisés, mais leur efficacité a diminué à cause de la résistance croissante aux antimicrobiens (Hutchings *et al.*, 2019). L'utilisation généralisée et sans discernement des antibiotiques par l'humain, par exemple en ne terminant pas un traitement prescrit, en utilisant des antibiotiques pour des infections virales et en les utilisant de manière excessive dans l'agriculture, a facilité l'acquisition de mécanismes de résistance supplémentaire pour les bactéries, en plus de leurs résistances intrinsèques (Xu *et al.*, 2023). Selon les estimations, la prolifération de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques est directement responsable d'environ 1.27 million de décès dans le monde en 2019, et ce chiffre augmentera si aucune mesure n'est prise (Murray *et al.*, 2022). En 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié un rapport détaillant les bactéries qui nécessitent des efforts urgents de recherches et de développement de nouveaux antibiotiques. Il a déterminé que *Acinetobacter*

*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et les *Enterobacteriaceae* constituaient une priorité critique (Tacconelli *et al.*, 2018).

## **1.2 *Pseudomonas aeruginosa***

Parmi les trois espèces critiques, *P. aeruginosa* nous intéresse particulièrement. *P. aeruginosa* est une gamma-protéobactérie Gram-négative en forme de bâtonnet. Elle est capable de survivre dans un large spectre d'environnements grâce à sa grande versatilité métabolique et à sa grande adaptabilité aux changements environnementaux. Elle peut infecter divers organismes vivants tels que les plantes, les animaux et les humains. Chez l'humain, *P. aeruginosa* est associée à des infections aiguës et chroniques telles que la mucoviscidose, la pneumonie sous ventilation mécanique et les infections urinaires. Ce pathogène opportuniste constitue une véritable menace en milieu hospitalier et est actuellement la bactérie la plus fréquemment associée aux infections nosocomiales. Elle affecte rarement les personnes en bonne santé, mais entraîne une morbidité et une mortalité élevées chez les patients atteints de mucoviscidose et les personnes immunodéprimées (Botelho *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

En plus d'être désignée par l'OMS comme un agent pathogène nécessitant d'urgence la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques, *P. aeruginosa* résistante aux antibiotiques a également été identifiée par les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies des États-Unis (CDC) comme une menace sérieuse pour la santé humaine et comme l'une des pathogènes "ESKAPE" (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et les espèces *Enterobacter*). Tous les membres de ce groupe, comme l'indique l'acronyme, sont capables d'échapper aux effets des antibiotiques (Fig. 1.1) (Botelho *et al.*, 2019).



**Figure 1.1 : Classification de *Pseudomonas aeruginosa* par différents organismes.** L'OMS classe *P. aeruginosa* parmi les agents pathogènes "critiques" pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques sont nécessaires de toute urgence, tandis que les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies des États-Unis (CDC) a désigné *P. aeruginosa* résistant aux antibiotiques comme une menace sérieuse et comme l'un des agents pathogènes ESKAPE à l'origine d'infections nosocomiales dans le monde entier. Figure tirée de (Botelho *et al.*, 2019).

Les traitements des cas présumés de *P. aeruginosa* comprennent la monothérapie et la thérapie combinée de plusieurs agents antimicrobiens. Cependant, le traitement devient de plus en plus difficile, car *P. aeruginosa* a la capacité exceptionnelle de développer ou d'acquérir des résistances à de nombreuses catégories de substances antibactériennes, même au cours du traitement d'une infection. Les mécanismes de résistances aux antibiotiques utilisés par *P. aeruginosa* peuvent être classés en trois catégories : intrinsèques, acquis et adaptatifs (Lister *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2019).

### 1.2.1 La résistance intrinsèque de *Pseudomonas aeruginosa*

La résistance intrinsèque est la capacité innée de la bactérie à réduire l'efficacité des antibiotiques grâce à sa structure et à ses fonctions biologiques. Pour *P. aeruginosa*, elle dépend de la faible perméabilité de sa membrane qui agit comme une barrière sélective, des systèmes d'efflux très

efficaces présents dans sa membrane externe et des enzymes qui inactivent les antibiotiques qui arrivent à entrer dans sa cellule (Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

La plupart des antibiotiques utilisés dans le traitement contre *P. aeruginosa* doivent pénétrer la membrane externe et se rendre dans le milieu intracellulaire afin d'interagir avec leur cible thérapeutique (Lambert, 2002). La membrane externe de *P. aeruginosa* est asymétrique avec un feuillet interne composée de phospholipides et un feuillet externe avec phospholipides et des lipopolysaccharides (LPS) (Rollauer *et al.*, 2015). La membrane externe de *P. aeruginosa* sert de barrière robuste aux antibiotiques. Sa perméabilité est de 12 à 100 fois inférieure à celle de la membrane externe de *E. coli*. Les antibiotiques doivent donc utiliser des porines pour pénétrer dans la cellule ou interagir avec les LPS afin de favoriser leur absorption. Les porines sont des protéines transmembranaires à tonneau  $\beta$  qui agissent comme un port. Elles peuvent être classées en quatre catégories : les porines non spécifiques qui permettent la diffusion de petites molécules hydrophiles, les porines spécifiques qui assurent le transport de certaines molécules, les "gated" porines responsables de l'absorption de complexes ioniques et les porines d'efflux qui sont un composant important des pompes d'efflux décrites par la suite. Les porines non spécifiques constituent la catégorie principale impliquée dans l'absorption des antibiotiques. La protéine OprF est la principale porine non spécifique. OprF a deux conformations, mais la plupart de ces protéines dans la membrane sont dans une conformation fermée et ne sont donc pas opérationnelles. Une petite population active réduirait ainsi la perméabilité de la membrane (Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

La bactérie peut également exporter les éléments toxiques de sa cellule à l'aide de systèmes d'efflux afin de prévenir leurs effets antimicrobiens. Ces systèmes utilisent des composants cytoplasmiques et périsplasmiques pour amener les antibiotiques et autres composants nocifs jusqu'à la porine d'efflux présente dans la membrane externe, qui les expulse ensuite. Certains systèmes d'efflux ciblent des antibiotiques spécifiques, mais la plupart d'entre eux peuvent expulser une large gamme d'antibiotiques non apparentés (Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

Enfin, *P. aeruginosa* produit des enzymes qui peuvent inactiver les antibiotiques en modifiant leur structure ou en les dégradant, tel que les  $\beta$ -lactamases et les enzymes modifiant les glycosides aminés. Elles ciblent les liaisons chimiques susceptibles d'être hydrolysées, telles que les amides et les esters souvent présents dans les antibiotiques. Les  $\beta$ -lactamases ciblent les bêta-lactamines, une classe de médicaments fréquemment prescrits qui comprend la pénicilline. Tous les antibiotiques de cette famille ont pour composant central un anneau  $\beta$ -lactame. L'enzyme désactive le médicament en brisant la liaison amide dans l'anneau. Les aminoglycosides quant à

elles contiennent un anneau d'aminocyclitol lié à des sucres aminés par des liaisons glycosidiques et sont couramment utilisées pour traiter les infections à *P. aeruginosa*. L'activité de cette famille d'antibiotiques est altérée par les enzymes qui modifient les groupes aminés et glycoside (Kapoor *et al.*, 2017; Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

### 1.2.2 La résistance acquise de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* peut acquérir une résistance aux antibiotiques ou renforcer ses résistances déjà acquises à la suite de mutations aléatoires dans son génome ou de l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal de gènes. Les mutations peuvent conférer des avantages pour la survie des bactéries en réduisant l'absorption des antibiotiques, en modifiant les cibles des antibiotiques et en renforçant l'expression des pompes d'efflux et des enzymes responsables de l'inactivation des médicaments. Certaines mutations peuvent diminuer l'expression ou modifier la fonction des porines non spécifiques, ce qui entraverait l'absorption de toutes les petites molécules hydrophiles, y compris les antibiotiques. D'autres mutations peuvent interférer avec les cibles antibactériennes en modifiant le site ou en les protégeant, empêchant ainsi les composés antimicrobiens de reconnaître leur cible et d'exercer leur effet. Enfin, comme indiqué précédemment, les pompes d'efflux et les enzymes inactivant les antibiotiques sont deux systèmes de défense intrinsèques importants. Par conséquent, si des mutations augmentaient l'expression ou l'efficacité des protéines impliquées dans ces deux systèmes, *P. aeruginosa* deviendrait moins sensible aux médicaments (Botelho *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

Si la bactérie ne développe pas de mutations qui lui confèrent des résistances antibactériennes supplémentaires, elle peut aussi les acquérir en incorporant des fragments d'ADN contenant des gènes de résistance dans un processus connu sous le nom de transfert horizontal de gènes. Les mécanismes de transfert horizontal de gènes comprennent la conjugaison, la transduction et la transformation. Au cours de la conjugaison, l'ADN est transféré d'une cellule à l'autre par un contact physique direct. La transduction est le transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par des bactériophages. La transformation est le processus par lequel la bactérie prend des fragments d'ADN qui ont été libérés dans son environnement et les intègre dans son génome (Botelho *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

### **1.2.3 La résistance adaptative de *Pseudomonas aeruginosa***

Pour répondre à une attaque d'antibiotiques ou à un stimulus environnemental, *P. aeruginosa* peut modifier ses gènes et sa production de protéines de manière réversible pour lutter contre la menace. Les mécanismes de résistance adaptative les mieux caractérisés sont la formation de biofilms et la génération de cellules persistantes. Un biofilm est un groupe de micro-organismes qui adhèrent les uns aux autres et qui peuvent se former sur des surfaces vivantes ou non vivantes. Il est enveloppé d'une matrice extracellulaire produite par les organismes eux-mêmes, composée de biopolymères, de polysaccharides et d'autres composants tels que des protéines, des métabolites et de l'ADN extracellulaire. Cette matrice protège les micro-organismes des effets des agents antimicrobiens et de la réponse immunitaire de l'hôte. Pour ce faire, elle crée un environnement altéré qui entrave, voire même bloque, la pénétration des antibiotiques et qui ralentit la croissance cellulaire, en induisant une réponse adaptative au stress et en favorisant la différenciation des cellules en cellules persistantes (López *et al.*, 2010; Stewart, 2002).

Les cellules persistantes sont l'une des réponses adaptatives de *P. aeruginosa* au traitement antimicrobien. Elles constituent un très petit sous-ensemble de cellules bactériennes (environ 1 %) présentes dans le biofilm. Elles peuvent survivre des concentrations élevées d'antibiotiques, mais ne possèdent pas de résistance. Les cellules persistantes sont souvent dans un état métabolique inactif à croissance lente, ce qui se traduit par une grande tolérance aux médicaments, car ces cellules ne produisent pas de cibles antimicrobiennes lorsqu'elles sont dans cet état. Il est essentiel de noter que ces cellules sont capables de rester viables et de se multiplier une fois la menace antibiotique passée, lorsqu'elles se trouvent dans cet état de latence (Lewis, 2007).

## **1.3 Développement d'antibiotiques nouveaux et innovateurs contre *Pseudomonas aeruginosa***

L'utilisation antérieure d'antibiotiques ciblant des processus essentiels chez les bactéries, tels que la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines, ainsi que la division cellulaire, a eu pour effet secondaire regrettable de sélectionner des sous-populations résistantes et donc de favoriser l'émergence de bactéries résistantes aux médicaments (Weirich *et al.*, 2017). Le traitement de ces souches résistantes de *P. aeruginosa* devient de plus en plus difficile et constitue un grave problème de santé publique à l'échelle mondiale. Comme le souligne l'OMS, il est urgent d'étudier le mécanisme de résistance de *P. aeruginosa* et de développer d'autres moyens de combattre les infections causées par ce micro-organisme (Tacconelli *et al.*, 2018). Cependant, malgré

l'urgence, le développement de nouveaux antibiotiques et d'autres stratégies thérapeutiques ne progresse que très lentement. Cela est dû à la variabilité et à la complexité de la résistance aux médicaments, au manque de compréhension du mécanisme de virulence, à la difficulté de trouver de nouvelles cibles et au manque d'intérêt des grands groupes pharmaceutiques. La découverte de composés avec de nouveaux modes d'action a été extrêmement ralentie et la plupart des antibiotiques en cours d'essais cliniques sont des dérivés d'antibiotiques déjà existants (Butler *et al.*, 2023; Prasad *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2023). Le dernier antibiotique approuvé par la Food and Drug Administration des États-Unis avec un nouveau mécanisme d'action contre les bactéries à Gram négatif a été découvert il y a près de 60 ans (Prasad *et al.*, 2022). La recherche et le développement d'antibiotiques est un processus coûteux et, sans une grande chance de trouver quelque chose de nouveau, les grandes entreprises pharmaceutiques ne veulent pas s'aventurer sur ce terrain sans profits potentiels (Xu *et al.*, 2023). Les chercheurs se sont maintenant tournés vers des environnements et des niches écologiques sous-explorés et des bactéries difficiles à cultiver pour essayer de trouver de nouvelles cibles (Pang *et al.*, 2019).

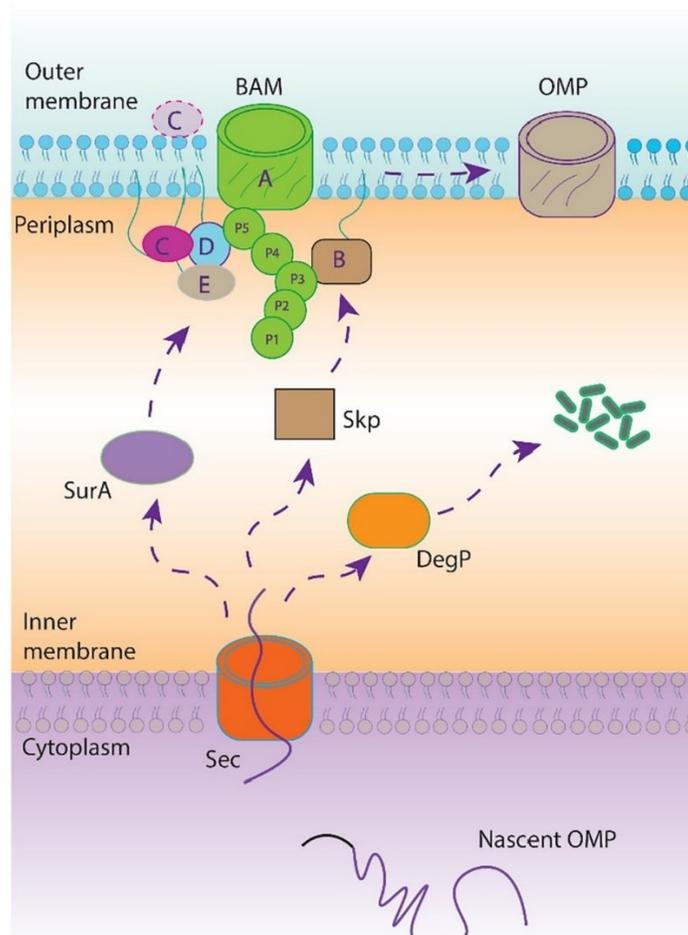
Une approche intéressante pour traiter les infections à *P. aeruginosa* consiste à contrôler les agents pathogènes sans les tuer, tout en préservant le microbiote endogène qui est généralement gravement affecté par les traitements antibiotiques qui ciblent sans discernement les fonctions cellulaires vitales. Cet objectif peut être atteint grâce à des médicaments qui perturbent le mécanisme de virulence des agents pathogènes sans les tuer directement. Cela limiterait la pathogénicité et ne contribuerait pas à la sélection de nouveaux micro-organismes résistants (Weirich *et al.*, 2017).

#### **1.4 La biosynthèse des OMPs comme cible potentielle des anti-infectieux**

La membrane externe est une cible attrayante, car les antibiotiques n'auraient pas besoin d'être transportés à travers celle-ci avant de pouvoir affecter leur cible. La membrane externe est le siège de plusieurs fonctions bactériennes essentielles et joue un rôle dans les interactions hôte-pathogène. En effet, chez les bactéries gram négatives, les protéines de la membrane externe (OMP) participent à de nombreuses fonctions telles que l'adhésion cellulaire, le transport de nutriments et de macromolécules, la communication cellulaire, la division cellulaire et la virulence (Xu *et al.*, 2023). La majorité de ces OMPs adoptent une architecture en forme de tonneau  $\beta$ . Ces protéines nécessitent des machineries spécialisées pour leur repliement : la machinerie d'assemblage des tonneaux  $\beta$  (BAM) et le module de translocation et d'assemblage (TAM). Les sections suivantes décriront l'état des lieux des connaissances de ces deux systèmes.

## 1.5 Biosynthèse des OMPs

Les OMPs sont synthétisés dans le cytoplasme par les ribosomes à partir de l'ARN messager. Les brins polypeptidiques naissants possèdent un signal peptidique dans leur domaine N-terminal. Le complexe SEC identifie ce signal et transloque les précurseurs des OMPs sous forme dépliée à travers la membrane interne jusqu'au périplasma. Dans l'espace périplasmique, le signal est clivé par une enzyme peptidase. Ensuite, les chaperonnes moléculaires Survival protein A (SurA), Seventeen kilodalton protein (Skp) et DegP présentes dans le périplasma identifient les OMPs et les transportent vers la membrane externe où ils sont reconnus, assemblés et insérés dans la bicouche lipidique par le complexe BAM (Fig. 1.2) (Weirich *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020).



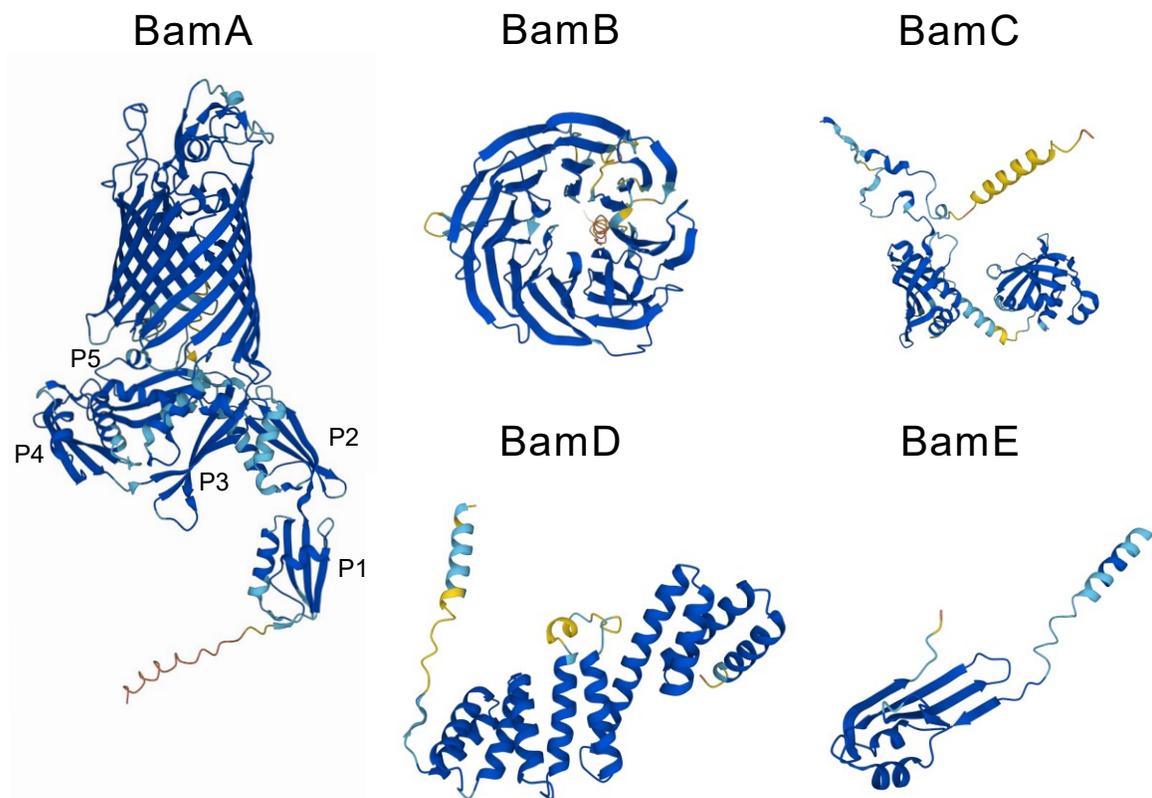
**Figure 1.2 : Biogenèse des protéines de la membrane externe** Les protéines de la membrane externe (OMPs) sont synthétisées dans le cytoplasme et acheminées dans le périplasma par la voie SEC. Des chaperonnes escortent ensuite les OMPs vers la machinerie d'assemblage de tonneaux  $\beta$  (BAM) pour leur repliement dans la membrane externe. Figure tirée de (Wu *et al.*, 2020).

## 1.6 Les chaperonnes SurA, Skp et DegP

SurA, Skp et DegP sont trois des chaperonnes les plus importantes chez *E. coli*. SurA appartient à la famille des peptidylpropyl isomérases et il a été démontré qu'elle a une activité générale de chaperonne. Skp, quant à elle, se lie aux OMPs dénaturées, mais pas les protéines périplasmiques ou cytosoliques dénaturées pour les amener à la membrane externe (Sklar *et al.*, 2007b). Par ailleurs, il a été démontré que la DegP possède à la fois une activité chaperonne et une activité protéolytique, qui dépendent de la température. DegP fonctionne comme une chaperonne moléculaire à basse température et elle possède une activité protéolytique à haute température. En dessous de 22 °C, DegP est protéolytiquement inactive. À 28 °C, l'activité protéolytique de DegP est faible, étant huit fois moins active qu'à 42 °C. Il y a une augmentation significative de l'activité protéolytique entre 32 °C et 42 °C. Or, l'activité chaperonne de la DegP à 37 °C diminue de deux tiers par rapport à ce qui était observé à 28 °C (Spiess *et al.*, 1999). SurA fonctionne comme la voie principale de transport des protéines non repliées, la plupart des protéines préférant cette voie, tandis que Skp et DegP travaillent ensemble dans une voie secondaire. Lorsque SurA n'est pas présente, Skp/DegP peut la remplacer pour éviter que la perte de la voie n'entraîne la mort de la cellule. En outre, la suppression de Skp et DegP entraîne l'accumulation toxique de protéines mal repliées et l'activation de la réponse au stress  $\sigma^E$ . Il a été donc suggéré que la fonction principale de Skp/DegP est de sauver les précurseurs protéiques qui ont dévié de la voie correcte en les rétablissant sur la voie correcte ou en les dégradant (Rizzitello *et al.*, 2001; Rollauer *et al.*, 2015; Sklar *et al.*, 2007b).

## 1.7 La machinerie d'assemblage de tonneaux bêta (BAM)

Le complexe BAM est retrouvé dans toutes les bactéries Gram négatives et a été identifié comme étant essentiel pour ces dernières. Il est composé de la protéine membranaire BamA qui est l'unité centrale et de plusieurs lipoprotéines accessoires dont le nombre varie d'une espèce à l'autre. Chez *E. coli*, il en existe quatre : BamB, BamC, BamD et BamE (Fig. 1.3) (Noinaj *et al.*, 2017). Le complexe BAM s'assemble en forme de chapeau, le domaine transmembranaire de BamA formant la couronne du chapeau et les protéines associées formant le bord (Ranava *et al.*, 2018). Les lipoprotéines accessoires sont ancrées sur la face périplasmique de la membrane externe et interagissent directement ou indirectement avec BamA. Parmi elles, seules BamA et BamD sont essentielles au complexe. Cependant, la délétion de BamB, BamC et BamD perturbe la fonction du complexe BAM, mais ne provoque pas la mort de la bactérie (Malinverni *et al.*, 2006).



**Figure 1.3 : Structures de chaque sous-unité du complexe BAM.** Structure monomérique des sous-unités du complexe BAM. Toutes les structures ont été obtenues à partir de la base de données AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>, consulté le 23 janvier 2024). Les identifiants UniProt des molécules du complexe BAM ont été utilisés pour accéder à la structure 3D : BamA (P0A940), BamB (P77774), BamC (P0A903), BamD (P0AC02) et BamE (P0A937). P1 à P5 correspondent aux domaines POTRA. AlphaFold calcule un indice de confiance pour chaque résidu, allant de 0 à 100, et lui attribue une couleur correspondante. Une couleur bleu foncé indique un indice de confiance très élevé, supérieur à 90, tandis qu'une couleur bleu clair indique un indice de confiance élevé, compris entre 90 et 70. Une couleur jaune indique un indice de confiance faible, compris entre 70 et 50, et une couleur orange indique un indice de confiance très faible, inférieur à 50. Figure adaptée de (Xu *et al.*, 2023).

### 1.7.1 BamA

BamA, auparavant appelée Omp85 et YaeT, a été initialement identifiée comme étant la protéine Omp85 chez *Neisseria meningitidis*. Cette protéine bactérienne a été reconnue comme étant fortement conservée et impliquée dans l'assemblage des OMPs. La croissance bactérienne ralentit de manière significative lors de l'inactivation d'Omp85, ce qui indique qu'elle est indispensable pour la bactérie. Les chercheurs ont ensuite analysé les protéomes des cellules

normales et des cellules dépourvues d'Omp85 afin d'étudier le rôle de Omp85. Ils ont constaté qu'Omp85 facilite l'assemblage et l'insertion d'une panoplie de protéines, telles que des porines, des sécrétines, des sidérophores et des phospholipases, dans la membrane externe (Voulhoux *et al.*, 2003). Par la suite, il a été démontré que BamA est également essentielle chez *E. coli* (Wu *et al.*, 2005).

BamA appartient à la superfamille Omp85 et est hautement conservée parmi les bactéries à Gram négatif. Les membres de cette famille sont caractérisés par un domaine transmembranaire C-terminal en forme de tonneau  $\beta$  et d'un certain nombre de domaines associés au transport de polypeptides (POTRA) en N-terminal qui varient d'une espèce à l'autre (Doyle *et al.*, 2022a). Le tonneau transmembranaire est composé de 16 brins  $\beta$  antiparallèles et l'association du premier et du dernier brin  $\beta$  par des liaisons hydrogènes ferment le tonneau (Fig. 1.3). Cependant, ces liaisons hydrogènes sont faibles, ce qui permet aux brins de se séparer et au tonneau de s'ouvrir latéralement. Cette ouverture latérale est un facteur important pour le rôle de BamA dans l'assemblage des OMPs (Noinaj *et al.*, 2013).

BamA de la plupart des bactéries Gram-négatives possède cinq domaines POTRA qui sont numérotés d'un à cinq à partir de l'extrémité N-terminale (Fig. 1.3). La similarité entre les séquences de chaque unité POTRA est faible, mais elles partagent des structures très semblables. Les domaines POTRA peuvent servir d'échafaudage auquel s'accrochent d'autres unités du complexe BamA (Wu *et al.*, 2020). Elles peuvent aussi jouer un rôle dans la reconnaissance des protéines substrats. Les domaines POTRA 3, 4 et 5 sont essentiels à la viabilité de *E. coli*, mais leur importance varie également en fonction de l'espèce (Kim *et al.*, 2007).

### 1.7.2 BamB

BamB est une hélice  $\beta$  à huit pales avec quatre brins  $\beta$  par pale (Fig. 1.3) qui interagit directement avec POTRA 3 de BamA. La déplétion de BamB entraîne une augmentation des OMPs mal repliés et une réduction de l'insertion des OMPs dans la membrane externe (Wu *et al.*, 2005). En outre, la perte de BamB modifie la perméabilité de la membrane externe, ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques et une diminution de la virulence de certains agents pathogènes (Xu *et al.*, 2023). Cependant, le rôle de BamB est encore inconnu. Il a été suggéré que BamB pourrait favoriser le transfert du précurseur de l'OMP à BamA à partir des chaperonnes (Noinaj *et al.*, 2011).

### 1.7.3 BamC

BamC se compose de deux domaines de préhension en hélice reliés par un lien flexible au milieu (Fig. 1.3) (Warner *et al.*, 2011). Il se lie à BamD et pourrait être responsable de la régulation de la fonction de BamD. Des études phénotypiques ont montré que la délétion de BamC n'a que de faibles effets sur les niveaux et l'assemblage des OMPs (Xu *et al.*, 2023).

### 1.7.4 BamD

BamD est le seul composant, autre que BamA, essentiel au complexe BAM et est également la lipoprotéine la plus conservée du complexe BAM. BamD est composé de 10 hélices alpha reliées par des boucles pour former cinq répétitions tetratricopeptidiques (Fig. 1.3). Le domaine C-terminal de BamD interagit avec BamC et BamE pour former BamCDE qui interagit directement avec BamA, BamD étant le point de contact. Sa région N-terminale peut reconnaître et lier le brin  $\beta$  en C-terminal de l'OMP. Elle serait responsable de la réception des OMPs dépliés et de leur transfert vers le tonneau  $\beta$  de BAM pour être repliés et assemblés dans la membrane externe (Sandoval *et al.*, 2011).

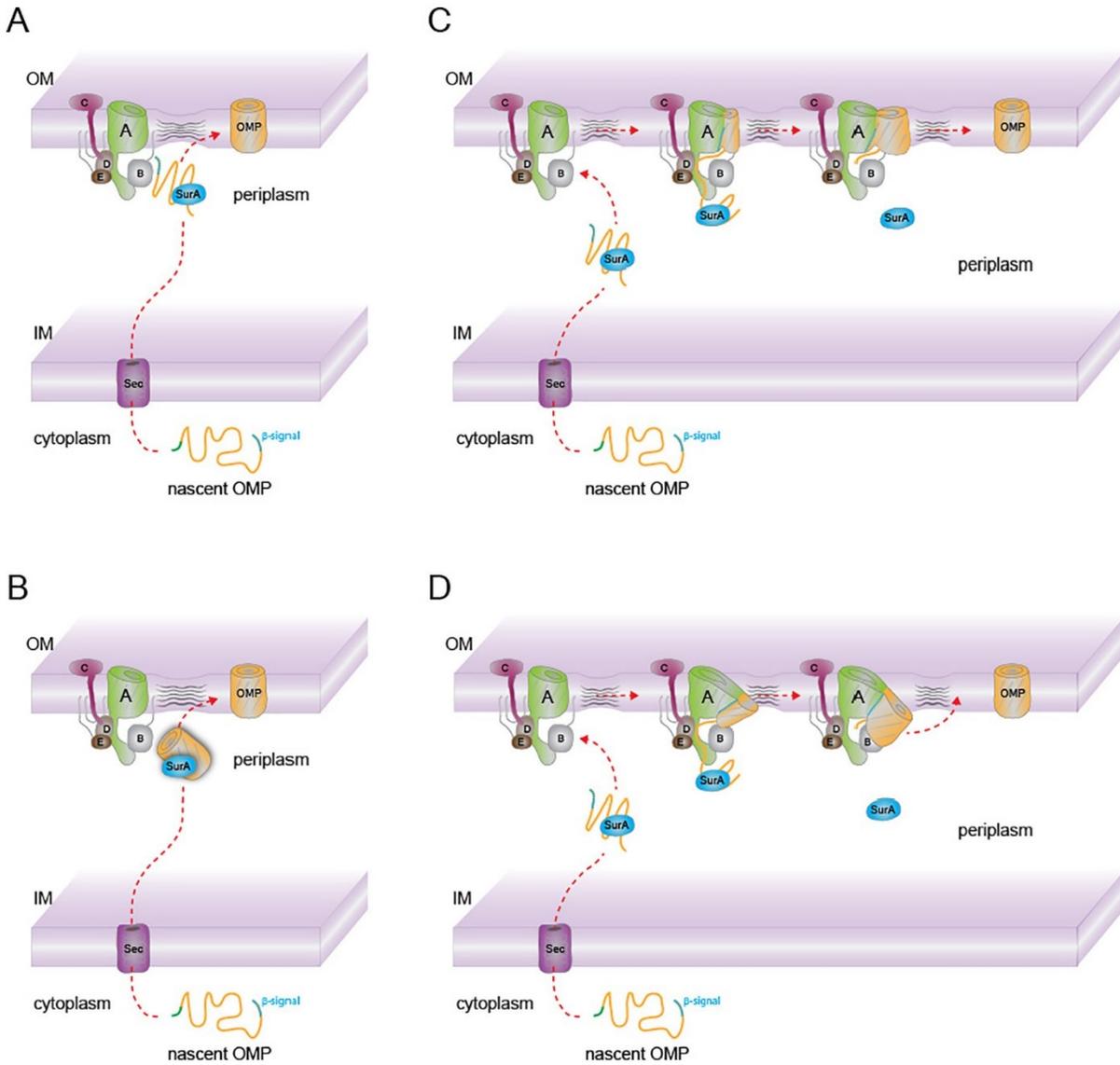
### 1.7.5 BamE

BamE est la lipoprotéine ayant le poids moléculaire le plus faible du complexe BAM, avec une taille d'environ 10 kD. Elle existerait sous la forme de monomères (Fig. 1.3) et d'un dimère, le dimère étant la forme active. Des études ont montré que les mutations de perte de fonction de BamE n'entraînent que des défauts mineurs de repliement de l'OMP. De plus, BamE contribue à l'interaction entre BamA et BamD (Sklar *et al.*, 2007a).

## 1.8 Les deux principales théories du mécanisme de BamA

La source d'énergie de l'activité de BamA demeure inconnue. Il n'y a pas de potentiel transmembranaire à travers la membrane externe, ni d'accès à l'hydrolyse des nucléotides, comme c'est le cas dans les réactions équivalentes au niveau de la membrane interne. L'énergie nécessaire à l'insertion des protéines dans les membranes est considérable et sans moyen de surmonter cette barrière énergétique, l'insertion sera impossible. Deux théories ont principalement été avancées pour expliquer le mécanisme de BamA. Le premier modèle propose qu'une fois que les OMPs substrats stabilisés par des chaperonnes sont livrés au complexe BAM, elles utilisent le bord exposé de la porte latérale ouverte de BamA comme modèle. Chaque brin ajouté déclenche la formation du brin suivant, dans un processus connu sous le nom

d'augmentation  $\beta$ , jusqu'à ce que la nouvelle OMP soit formée et qu'elle se détache. Le second modèle propose que le complexe BAM sert uniquement à amener les précurseurs des OMPs liés aux chaperonnes vers la membrane externe où ils s'insèrent dans une membrane préalablement préparée. Le tonneau de BamA préparerait la membrane en la perturbant localement. Aucune de ces hypothèses n'a été démontrée expérimentalement de manière concluante comme s'appliquant à tous les OMPs. Il se peut que les deux modèles soient vrais et dépendent de l'OMP qui est en cours de repliement. En outre, des ramifications de ces deux mécanismes ont également été proposées. Une variante du premier modèle propose que l'OMP naissante soit formée le long de la surface du feuillet interne et qu'une fois assemblée, BamA effectue un mouvement de balancier afin de la placer dans la membrane externe. Une variante du second modèle BamA est que l'OMP peut être partiellement ou entièrement pliée avant son insertion par BAM (Fig. 1.4) (Wu *et al.*, 2020). Les deux théories principales ont reçu un soutien plus ou moins important dans la littérature scientifique.



**Figure 1.4 : Mécanismes hypothétiques du complexe BAM.** (A) Dans ce modèle, BAM sert de complexe de transport pour localiser les OMPs à la membrane externe. Les OMPs sont ensuite insérées directement dans la membrane grâce à la déstabilisation locale de la membrane par BamA. (B) Une variante du modèle A est représentée, dans laquelle les OMPs naissantes sont partiellement ou totalement pré-plies avant d'être insérées par BAM. (C) Dans ce modèle, BAM sert à recruter les OMPs à la membrane externe, puis les bords exposés du tonneau de BamA servent de modèle pour catalyser la formation d'un tonneau hybride BamA:OMP par augmentation  $\beta$ . Chaque brin ajouté nucléarise la formation du brin suivant jusqu'à ce que l'échange de brins se produise au sein de la nouvelle OMP, achevant ainsi le processus de biogenèse. Pour éviter la formation d'un super-pore à l'intérieur de la membrane, la nouvelle OMP est soupçonnée de bourgeonner ou de s'éloigner du tonneau de BamA. (D) Une variante récemment proposée du modèle C, le modèle de balancement, propose que les OMPs naissantes sont repliées le long de l'interface de la membrane et doivent subir un mouvement de balancement médié par BamA pour être introduites dans la membrane. Figure tirée de (Wu *et al.*, 2020).

### 1.8.1 Premier modèle : la porte latérale de BamA sert de modèle

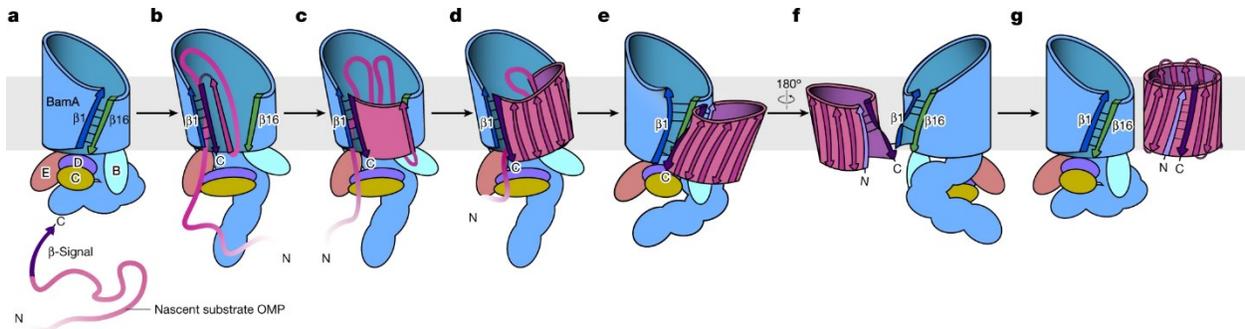
Le premier modèle est appuyé par plusieurs sources, notamment la présence d'une porte latérale et l'observation que BamA subit des changements de conformation entre un état ouvert vers l'extérieur et un état ouvert vers l'intérieur (Gu *et al.*, 2016). Le verrouillage de la porte latérale par des liaisons disulfures entraîne la mort de la bactérie (Noinaj *et al.*, 2014). Cela suggère que l'ouverture de la porte latérale et l'accès au premier et au dernier brin du tonneau  $\beta$  sont importants pour la fonction de BamA (Noinaj *et al.*, 2013). En outre, les précurseurs des OMPs possèdent un signal conservé en C-terminal qui reflète le 16<sup>ème</sup> brin de BamA, ce qui implique fortement qu'ils interagissent. Le dernier acide aminé de cette séquence est une phénylalanine très conservée qui s'est avérée cruciale pour l'assemblage des OMPs *in vivo*. L'élimination de cette phénylalanine retarde considérablement le repliement de l'OMP (Gessmann *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2006). Récemment, plusieurs études ont démontré qu'elles pouvaient réticuler les intermédiaires de repliement de plusieurs protéines tels que EspP, une sérine protéase extracellulaire, et BamA elle-même avec le tonneau de BamA (Albenne *et al.*, 2017; Tomasek *et al.*, 2020). En outre, des études de réticulation avec Sam50, un orthologue conservé de BamA dans les mitochondries, suggèrent également qu'une protéine précurseur pénètre dans le domaine en tonneau de Sam50 et s'insère ensuite dans la membrane par le biais d'une interaction avec la porte latérale, d'une manière systématique et par étapes (Höhr *et al.*, 2018).

### 1.8.2 Deuxième modèle : la porte latérale de BamA perturbe la membrane

Le second modèle BamA est appuyé par les observations selon lesquelles plusieurs OMPs de *E. coli* peuvent se replier spontanément dans des bicouches synthétiques et n'ont donc pas besoin d'une machinerie spéciale pour s'intégrer dans la membrane. De plus, il a été prouvé que les lipides s'incorporent plus rapidement dans les membranes fines (Burgess *et al.*, 2008). Une simulation de la dynamique moléculaire a révélé que BamA de *Neisseria gonorrhoeae* diminuait l'ordre des lipides près de la porte latérale d'un facteur de trois et amincissait la membrane de 16 Å par rapport au côté opposé du tonneau. Cela serait dû au fait que la ceinture hydrophobe du tonneau BamA  $\beta$  est significativement réduite en largeur le long du brin C-terminal par rapport au côté opposé du tonneau (Noinaj *et al.*, 2013). Un autre point d'appui pour le second modèle est l'observation que BamA avec sa porte latérale verrouillée par des liaisons disulfures peut encore catalyser le repliement de l'OMP. La létalité mentionnée précédemment de la porte latérale verrouillée ne serait ainsi pas attribuable à la perte de l'activité de BamA (Doerner *et al.*, 2017).

### 1.8.3 Aperçu du mécanisme à partir de la cryomicroscopie électronique

Des études récentes ont permis de mieux comprendre le mécanisme de BamA en utilisant la cryomicroscopie électronique pour observer les intermédiaires de repliement d'EspP. Le mécanisme de BamA suivant a été proposé à partir de ces observations. La protéine substrat s'insère dans le tonneau de BamA à partir de son extrémité C-terminale, et le signal  $\beta$  se lie au premier brin  $\beta$  de BamA, laissant un surplomb extracellulaire. La protéine substrat continue à se replier progressivement en feuillets  $\beta$  antiparallèles à partir de l'interface hybride vers BamA. Le surplomb extracellulaire initie ensuite la fermeture du tonneau par des interactions avec le premier brin  $\beta$  de EspP. Les liaisons hydrogène formées entre le premier et le dernier brin d'EspP sont préférées par la protéine par rapport à l'hybridation avec le brin  $\beta$  de BamA. Les extrémités N et C d'EspP forment ainsi des liaisons hydrogène, brisant successivement les liaisons entre EspP et BamA. BamA prend également l'initiative de se détacher de l'interface hybride et de se séparer de l'OMP assemblé (Fig. 1.5) (Doyle *et al.*, 2022b; Shen *et al.*, 2023).



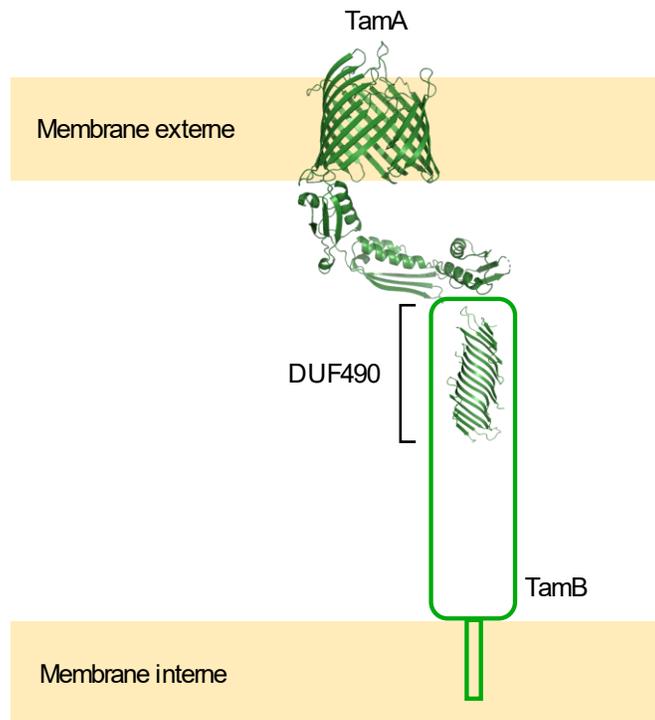
**Figure 1.5 : Mécanisme proposé pour le complexe BAM.** a) L'OMP substrat s'insère dans le tonneau de BamA à partir de son extrémité C-terminale. b) Le brin  $\beta$  C-terminal de l'OMP substrat interagit avec le brin  $\beta 1$  N-terminal de BamA au niveau de l'ouverture latérale. c-d) L'OMP substrat continue à se replier en feuillets  $\beta$  antiparallèles à partir de l'interface du tonneau hybride. e) L'OMP substrat se replie en tonneau par des interactions entre son brin  $\beta$  N-terminal et le surplomb de son brin C-terminal  $\beta$ . BamA ferme également son tonneau en enroulant ses brins N-terminaux vers son extrémité C-terminale pour se détacher de l'interface hybride, rompant les interactions avec l'OMP substrat. f) Rotation des tonneaux hybrides de  $180^\circ$  le long de l'axe Y. g) BAM séparée et l'OMP substrat repliée. Figure tirée de (Shen *et al.*, 2023).

## 1.9 Le module de translocation et d'assemblage (TAM)

BamA a longtemps été considérée comme suffisante pour l'insertion de toutes les OMPs. Cependant, un second complexe d'assemblage des protéines transmembranaires appelé module de translocation et d'assemblage (TAM) a récemment été identifié chez les protéobactéries, contribuant également à la biogenèse de la membrane externe (Selkrig *et al.*, 2012). Cette

nouvelle machinerie est composée de deux sous-unités, TamA et TamB, formant un complexe trans-enveloppe reliant la membrane externe et interne (Fig. 1.6). TamA est une protéine de la famille des Omp85 ancrée dans la membrane externe, et est homologue de BamA, l'unité catalytique de la machinerie BAM (Selkrig *et al.*, 2012). La protéine TamB est insérée dans la membrane interne par une hélice N-terminale transmembranaire et ne possède pas d'homologue connu. Le système TAM n'est pas essentiel, mais est requis pour la virulence de nombreux modèles pathogènes tels que *Salmonella*, ou *Proteus mirabilis*. L'association de TamA et TamB permet le repliement et l'assemblage spécifique de certaines protéines de la membrane externe, incluant les facteurs de virulence appartenant à la famille des autotransporteurs, ou le système de translocation du LPS (FimD) (Selkrig *et al.*, 2012; Stubenrauch *et al.*, 2016). Cependant, la gamme complète de protéines TAM-dépendantes reste encore inconnue. La délétion du complexe TAM chez les bactéries telles que *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Vibrio fischeri* entraîne un défaut de colonisation et une perte de virulence, suggérant que le complexe TAM est un élément important dans la virulence de plusieurs pathogènes à Gram négatif (Burall *et al.*, 2004; Selkrig *et al.*, 2012; Stubenrauch *et al.*, 2019). Les expériences préliminaires du laboratoire réalisées chez *Pseudomonas aeruginosa*, un important pathogène impliqué dans les infections nosocomiales, montre qu'une mutation par insertion de transposons inactivant le gène TamA ou TamB entraîne un défaut de formation de biofilm, un trait de virulence majeur de la bactérie.

Par ailleurs, les bactéries à Gram négatif, telles que *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes, remodelent leur membrane externe en réponse au stress afin de maintenir l'intégrité de la membrane en tant que barrière efficace et de favoriser ainsi la survie de l'hôte. La délétion du complexe TAM a entraîné une augmentation de la perméabilité de la membrane externe et une sensibilité accrue aux antibiotiques de haut poids moléculaire, ce qui implique son rôle dans le remodelage. La carence en TAM, et plus particulièrement en TamA, augmente la capacité de l'hôte à se débarrasser de la colonisation intestinale par *K. pneumoniae* lors d'une infection pulmonaire ou d'une bactériémie. Ainsi, le complexe TAM semble être une cible très attrayante pour contrôler un pathogène sans le tuer (Jung *et al.*, 2021).



**Figure 1.6 : Structure du complexe TAM.** TamA (PDB : 4C00 ; Gruss *et al.*, 2013) est une protéine appartenant à la famille des Omp85 ancrée dans la membrane externe. TamA interagit avec le domaine DUF490 de TamB, une protéine ancrée à la membrane interne par une hélice transmembranaire N-terminale, pour former le complexe TAM. Bien que la TamB n'ait pas été entièrement cristallisée, la moitié de son domaine DUF490 (PDB : 5VTG ; Josts *et al.*, 2017) a été cristallisée. Le domaine DUF490 consiste en un taco amphipathique qui est proposé pour interagir avec les domaines transmembranaires des OMPs non repliés.

### 1.9.1 TamA

Les cristaux de TamA ont révélé qu'elle est composée un tonneau  $\beta$  à 16 brins antiparallèles en C-terminal et de trois domaines POTRA en N-terminal qui s'étendent dans le périplasme (Fig. 1.5) (Gruss *et al.*, 2013; Selkrig *et al.*, 2012). Une caractéristique structurale très inhabituelle située au niveau du brin 16 en C-terminal rappelle celle de BamA. Le 16<sup>ème</sup> brin n'est pas complètement refermé avec le premier brin, mais forme au contraire un coude vers l'intérieur. Ce coude se traduit par seulement trois liaisons hydrogènes entre les brins 1 et 16, de sorte que le lien entre les deux brins est très faible. Les brins peuvent donc se séparer et former ainsi une porte latérale (Gruss *et al.*, 2013). L'existence d'une porte latérale a été confirmée par le calcul de l'énergie nécessaire pour ouvrir la porte. Des chercheurs ont déterminé qu'elle était d'environ 5 à 10 kcal/mol pour une grande séparation de 15 Å, ce qui est similaire à l'énergie requise pour

BamA (Bamert *et al.*, 2017). TamA possède également une ceinture aromatique asymétrique, les brins situés près de la porte latérale étant plus courts que ceux situés du côté opposé (Selkrig *et al.*, 2015).

Les domaines POTRA ont d'abord été considérés comme similaires à ceux des BAM en termes de structure et de flexibilité. Cependant, des études plus approfondies ont montré que seul le domaine POTRA 3 de TamA est semblable à celui de BamA (Selkrig *et al.*, 2015; manuscrit en préparation en annexe). Les deux autres domaines POTRA de TamA sont significativement différents en termes de séquence et de structure. L'une des principales différences structurelles réside dans le fait que les trois domaines POTRA de TamA forment une structure rigide par rapport aux domaines POTRA très flexibles de BamA (Selkrig *et al.*, 2015). L'orientation de ces domaines POTRA de TamA diffère de celle des domaines POTRA de BamA. De plus, les domaines POTRA de TamA possèdent la particularité d'interagir avec la membrane (voir manuscrit en préparation en annexe).

### 1.9.2 TamB

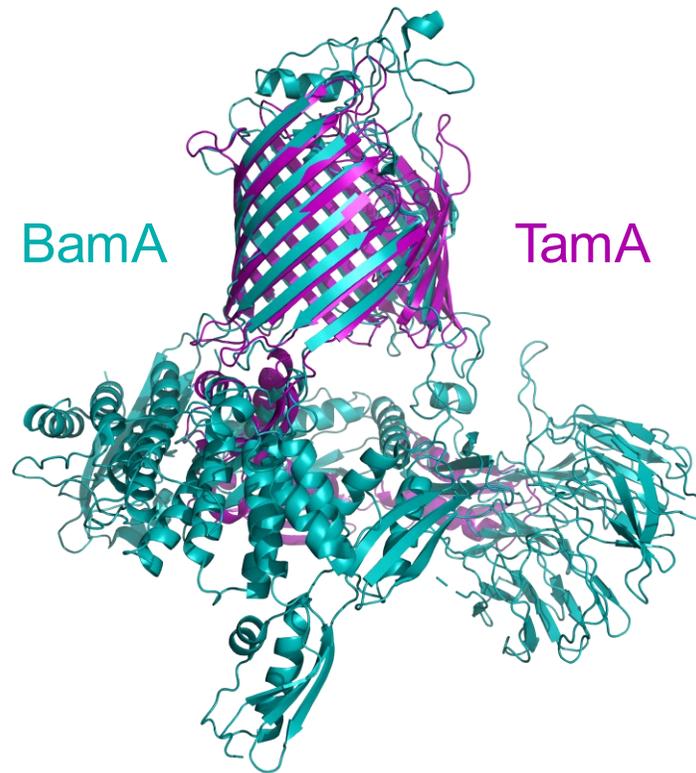
TamB est une protéine ancrée dans la membrane interne. Elle couvre le périplasma et interagit avec le domaine POTRA 1 de TamA par l'intermédiaire de son domaine DUF490 qui est bien conservé. Le TamB complet n'a pas encore été entièrement cristallisé et donc sa structure exacte reste inconnue. Cependant, la moitié du domaine DUF 490, caractéristique de TamB, a pu être cristallisée. La région est constituée d'un feuillet  $\beta$  concave, en forme de taco, avec un intérieur hydrophobe (Fig. 1.5). L'analyse de ses séquences et des modélisations moléculaires permettent de supposer qu'une grande partie de TamB partage cette conformation. L'intérieur hydrophobe qui s'étend sur le périplasma suggère que TamB pourrait jouer le rôle de chaperonne pour les protéines membranaires à travers le périplasma jusqu'à TamA. L'intérieur du pli est suffisamment large et profond pour accueillir un seul brin  $\beta$  étendu et le protéger pendant le transport (Josts *et al.*, 2017).

Chez *E. coli*, TamB, AsmA et quatre autres protéines analogues à AsmA (YhdP, YdbH, YicH et YhjG) ont été étudiées pour leur rôle potentiel dans le transport des phospholipides et la biogenèse de la membrane externe. Des inactivations d'une ou plusieurs de ces protéines ont été générées et la perméabilité de la membrane externe à divers antibiotiques et sels biliaires des mutants a été mesurée par la suite. Les chercheurs ont déterminé que TamB et ses paralogues YhdP et YdbH sont essentielles pour maintenir l'homéostasie lipidique de la membrane externe. Ces protéines sont redondantes, mais pas équivalentes dans l'exécution de

cette fonction. Seule leur perte combinée est létale pour la bactérie. Il est intéressant de noter que ces protéines sont des homologues de Vps13 et Atg2, deux membres d'une famille de transporteurs de lipides récemment identifiée. Pris ensemble avec le fait que le transport antérograde des phospholipides vers la membrane externe est un processus essentiel pour la biogenèse de la membrane externe, TamB, YhdP et YdbH seraient des transporteurs de phospholipides entre les membranes interne et externe. Il convient de noter que TamA s'est avérée nécessaire à la fonction de TamB dans le transport des phospholipides, ce qui est conforme à d'autres expériences selon lesquelles la suppression de l'un ou l'autre des composants, ou des deux, abolit l'activité de la TAM (Ruiz *et al.*, 2021; Selkrig *et al.*, 2012).

### 1.10 Évolution du complexe TAM

Des études sur l'évolution des deux sous-unités du complexe TAM ont été réalisées. Il a été constaté que TamA et une protéine étroitement apparentée, TamL, sont confinées respectivement aux protéobactéries et aux bacteroidota/chloroflexota, tandis que TamB est répartie dans presque toutes les espèces bactériennes ayant une membrane externe (Heinz *et al.*, 2015). Dans les micro-organismes dépourvus de TamA, TamB est souvent encodée avec BamA et les deux peuvent interagir. Les analyses phylogénétiques indiquent que TamB était présente assez tôt dans l'évolution bactérienne et suggèrent que les premiers composants d'assemblage de la membrane externe auraient été un complexe BamA-TamB. Un modèle d'évolution de la TAM postule que TamA est le résultat d'une duplication génétique de BamA qui a ensuite acquis les domaines POTRA caractéristiques de TamA que nous voyons aujourd'hui par une adaptation drastique ou un échange partiel de séquence de deux domaines POTRA (Heinz *et al.*, 2015). L'alignement structurel de TamA et de BamA a révélé un très haut degré de similitude entre les deux (Fig. 1.7). Les études évolutives ainsi que les similitudes structurelles entre TamA et BamA ont conduit à l'hypothèse que ces protéines partagent des mécanismes communs (Bamert *et al.*, 2017; Gruss *et al.*, 2013).

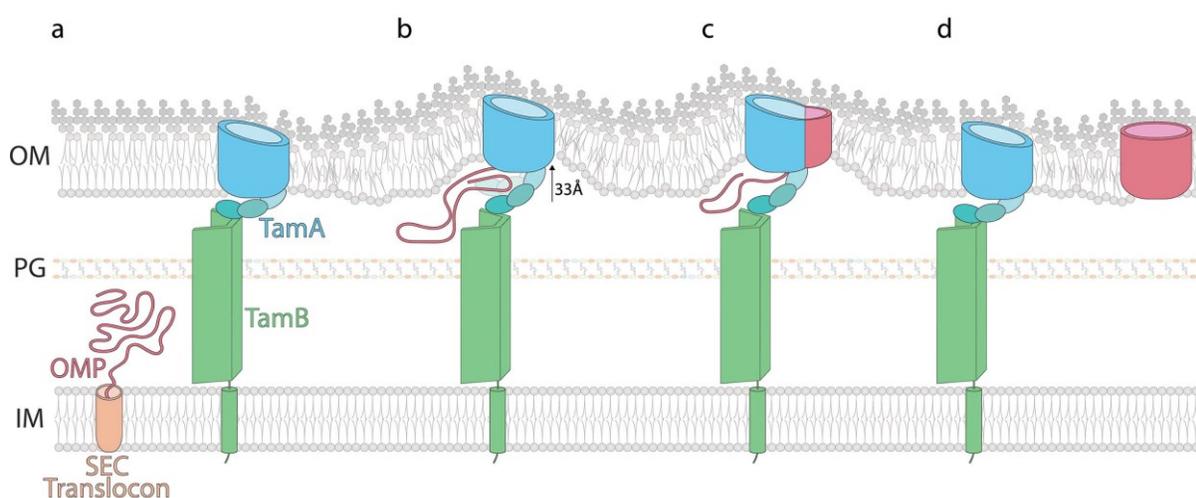


**Figure 1.7 : Alignement structurel de BamA et TamA.** Alignement structurel de BamA (PDB 5D0O, aqua) et TamA (PDB 4C00, violet). Les différents nombres de cisaillement pour les domaines en tonneau de TamA (S=20) et BamA (S=22) (Noinaj *et al.*, 2015) se distinguent dans la superposition, car les brins  $\beta$  dans le tonneau de TamA sont plus proches d'être perpendiculaires à la membrane (Bamert *et al.*, 2017).

### 1.11 Le mécanisme du complexe TAM

Tel que BAM, le complexe TAM doit également surmonter un manque de sources d'énergie pour son activité. La connexion de TamA à TamB ancrée à la membrane interne permet à TamA d'avoir plus de solutions potentielles pour résoudre ce problème que le complexe BAM. Des études utilisant les techniques de microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D) et de réflectométrie neutronique à contraste magnétique (MCNR) ont permis de mieux comprendre les mécanismes potentiels du complexe TAM. TamA a été reconstituée sur un environnement lipidique planaire. Les changements chez TamA ont ensuite été mesurés lorsqu'elle se lie à une autre protéine, telle que TamB et Ag43. Les domaines POTRA s'étendent sur 44 Å dans le périplasme à partir de la bicouche lipidique au repos, et ils interagissent avec TamB qui s'étend également dans le périplasme sur une longueur de 160 Å. Or, la longueur du périplasme est d'environ 210 Å, donc le complexe des domaines POTRA avec TamB couvre la quasi-totalité du

périplasma. Lorsqu'une protéine substrat se lie, les domaines POTRA s'étendent de 44 à 77 Å et poussent contre TamB. Cependant, TamB est fortifiée par la couche de peptidoglycane et la pression de turgescence, ce qui entraîne une remontée de TamA (Shen *et al.*, 2014). Cela déforme la membrane externe et augmente le désordre lipidique, ce qui abaisse la barrière énergétique nécessaire à l'insertion de l'OMP. Les substrats pénètrent dans le tonneau et utilisent le brin latéral libre de la porte comme modèle. Une fois le nouvel OMP plié et libéré dans la membrane externe, le bras POTRA se rétracte et le complexe TAM est réinitialisé (Fig. 1.8) (Stubenrauch *et al.*, 2019).



**Figure 1.8 : Mécanisme proposé pour le complexe TAM.** Par souci de clarté, le complexe BAM n'est pas représenté. (a) Un substrat est transloqué à travers la membrane interne (IM) par l'intermédiaire du translocon SEC. Le complexe TAM est dans une conformation prête pour le substrat. Les caractéristiques structurales du tonneau de TamA provoquent un amincissement de la membrane et une augmentation du désordre lipidique près de la porte latérale de la TamA. (b) Le substrat traverse le périplasma et entre en contact avec TAM. Cela entraîne un changement structural dans TamA. Ses domaines POTRA s'étendent à 33 Å du tonneau β. TamB est rigidifié par la couche de peptidoglycane (PG) et la pression de turgescence de la membrane interne, de sorte que le mouvement des domaines POTRA provoque un soulèvement local de la membrane externe (OM), ce qui augmente le désordre lipidique et abaisse l'énergie d'activation requise pour l'insertion du substrat. (c) Le substrat traverse le lumen de TamA et utilise les brins β de la porte latérale de TamA comme modèle pour se replier lui-même en un tonneau β. (d) Le substrat est libéré dans la membrane externe, ce qui permet aux domaines POTRA de se rétracter de 33 Å, de sorte que TAM est replacé dans sa conformation prête à recevoir le substrat. Figure tirée de (Stubenrauch *et al.*, 2019).

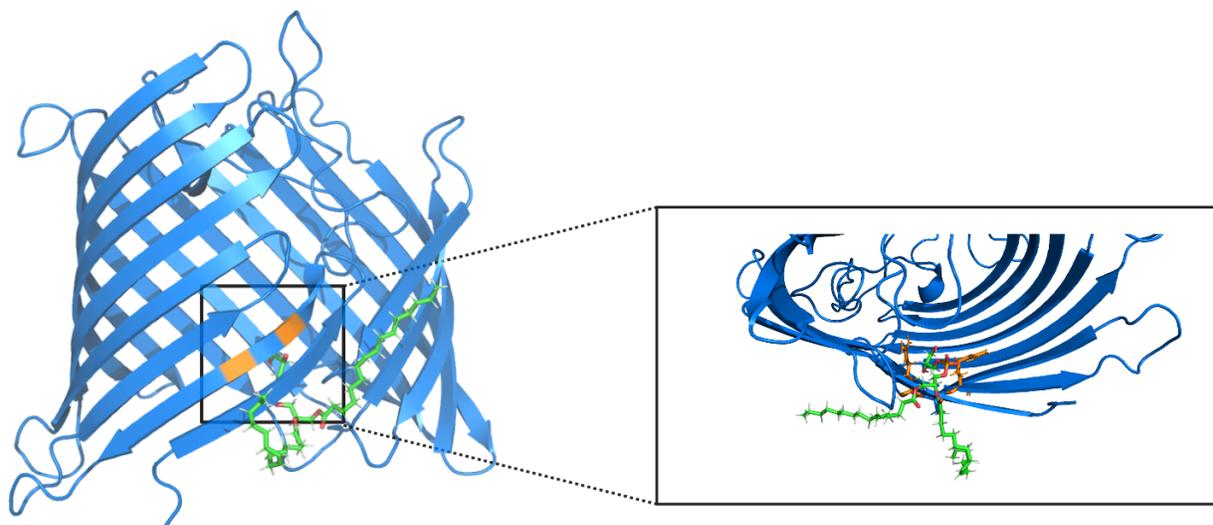
## 1.12 Les interactions possibles entre BAM et TAM

Il n'est pas clair si BAM et TAM agissent par des voies parallèles indépendantes ou s'ils collaborent pour assembler et insérer les OMPs dans la membrane externe. Des découvertes

récentes ont montré que TAM et BAM interviennent toutes les deux dans le repliement de la protéine FimD. Le complexe BAM peut initier la biogenèse de FimD à lui seul, mais l'assemblage est inefficace par rapport à l'assemblage par les deux complexes (Stubenrauch *et al.*, 2016). Il semble donc que TAM aide BAM d'une manière ou d'une autre. De plus, la séquence de FimD a été analysée et a révélé que certaines sections du tonneau de FimD lient sélectivement BamA ou TamA, tandis que d'autres peuvent lier les deux de manière égale (Bamert *et al.*, 2017). Les complexes BAM et TAM peuvent collaborer de trois façons. Ils peuvent assembler la même protéine mais intervenir à différents étapes, créer un supercomplexe pour replier le précurseur protéique, ou TAM peut s'activer dans certaines conditions pour aider BAM à assembler et à insérer les OMPs dans la membrane externe (Albenne *et al.*, 2017).

### 1.13 Modélisation moléculaire de la porte latérale de TamA

Une collaboration avec Patrick Lagüe de l'Université Laval nous a permis de mettre en évidence par modélisation moléculaire que TamA possède des sites de liaison conservés avec des phospholipides au niveau de son site actif, la porte latérale de son tonneau  $\beta$ . L'analyse des séquences de TamA a montré que ces sites sont des arginines (R286 et R288). Ainsi, les têtes polaires des lipides interagiraient avec les chaînes latérales arginine (Fig. 1.9).



**Figure 1.9 : Simulation de dynamique moléculaire de TamA avec un lipide.** Diagramme en ruban du tonneau de TamA de *P. aeruginosa* (Uniprot ID Q9I0U1) interagissant avec une molécule de lipide (vert). Les arginines conservées, qui sont prédites comme étant des sites d'interaction avec les phospholipides, sont surlignées en orange. La structure a été obtenue à partir de la base de données AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>, consulté le 08 octobre 2023).

L'arginine R286 est bien conservée chez les espèces de *Pseudomonas*, tandis que l'arginine R288 est parfois remplacée par une lysine, un acide aminé ayant également une chaîne latérale chargée positivement (Fig. 1.10).

<i>P. aeruginosa</i>	FEGVRVDAAPTQAQADGARQAIPVAVRLEARKPRTMGVGLGFSTDVGARARFNWTRHWVN	297
<i>P. tritici</i>	FNSVVVAPEFEKA---RKTKVLPLHGMVSPRTEIETGVGYSTDVGPVKASWRKPWMN	292
<i>P. carbonaria</i>	FDGVRVDAVPAQAS----AETIPVNVLLTTRKPRTFGVGLGFSTDVGPGRFNWTRHWAN	293
<i>P. extremaustralis</i>	FEGVRVDAAPAASA----NDVIPVAVRLETRKPRTMGLGLGYSTDVGPGRKANWTRHWVN	291
<i>P. fluorescens</i>	FEGVRVDAAPAAST----HDIIPVAVRLETRKPRTMGLGLGFSTDVGPGRKANWTRHWVN	291

**Figure 1.10 : Alignement des séquences de TamA de diverses espèces de *Pseudomonas*.** Les séquences TamA de diverses espèces de *Pseudomonas* ont été alignées à l'aide de l'outil Clustral Omega de l'Institut européen de bio-informatique de l'EMBL. Les séquences alignées correspondent à *P. aeruginosa* (Uniprot ID Q9I0U1), *P. tritici* (Uniprot ID A0A8I0CVI9), *P. carbonaria* (Uniprot ID A0A7U7ESU2), *P. extremaustralis* (Uniprot ID A0A5M9IW46), et *P. fluorescens* (Uniprot ID A0A5E6MV42). Les sites de liaison aux phospholipides conservés prédits par la modélisation moléculaire sont mis en évidence en rouge.

## 1.14 Hypothèse et objectifs de recherche

Cette étude vise à étudier l'importance des deux arginines (R286 et R288) dans la porte latérale de TamA pour son activité insertase. De plus, elle cherche à valider ces arginines en tant que sites de liaison aux phospholipides, comme prédit par les simulations de dynamiques moléculaire. Les arginines interagiraient avec les phospholipides, limitant potentiellement leur entrée dans la cavité de TamA. Une invasion du tonneau par les phospholipides empêcherait l'entrée des vrais substrats. Cette interaction pourrait également faciliter le transport des phospholipides par TamB. Plusieurs objectifs ont été établis pour atteindre ces buts:

Objectif 1 : Clonage, production et purification de versions mutantes de TamA dans lesquelles les arginines ont été remplacées par des alanines (R286A\_R288A) ou des acides aspartiques (R286D\_R288D).

Objectif 2 : Comparer les effets des mutations Arg/Ala et Arg/Asp sur l'activité insertase de TamA dans un modèle de protéoliposome

Objectif 3 : Cristallisation de TamA avec un ligand lipidique pour obtenir des données de diffraction d'arginines interagissant avec des lipides par cristallographie aux rayons X.

## 2 Méthodologie

---

### 2.1 Mesure de l'activité insertase de TamA et de ses mutants dans un modèle de protéoliposome

Un objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des mutations des arginines (R286 et R288) dans la porte latérale de TamA sur l'activité insertase de TamA à l'aide d'un modèle de protéoliposome. Pour ce faire, une OMP substrat dénaturée est incubée dans un liposome avec TamA ou un de ces mutants et son repliement est suivi au cours du temps. Cette approche est possible car les tonneaux  $\beta$  des OMPs sont capable de tolérer les conditions dénaturantes du SDS-PAGE et parce que les OMPs migrent différemment selon qu'elles sont dénaturées ou repliées. Cela permet d'évaluer la proportion de protéines bien repliées par densitométrie des bandes après la révélation des gels SDS-PAGE. Pour réaliser le test d'activité insertase, il faut TamA, des versions mutantes de TamA (R286A\_R288A et R286D\_R288D), un OMP substrat (OmpX) et des liposomes.

### 2.2 Productions de TamA mutantes par clonage RF

La première étape consiste à muter les arginines conservées en alanines (R286A\_R288A) ou en acides aspartique (R286D\_288D) afin de modifier la charge de ces résidus. La charge de certains résidus s'est avérée d'une importance cruciale pour l'assemblage et la fonction des protéines. L'autotransporteur EspP dépend du résidu R1297 sur son 12<sup>ème</sup> brin  $\beta$  pour se replier correctement (Shen *et al.*, 2023) et TamB dépourvue des résidus L1049 et I1102 n'a pas réussi à compléter le knock-out de TamB de *E. coli* (Josts *et al.*, 2017).

Les mutations ont été obtenues par clonage sans restriction (clonage RF) en raison de sa facilité d'utilisation et de ses puissantes capacités. Le clonage RF permet l'insertion de presque n'importe quel fragment dans une variété de cellules à presque n'importe quelle position. Les amorces sont conçues pour se chevaucher avec l'insert souhaité et le plasmide final. Les amorces sont ensuite utilisées dans une première PCR avec de l'ADN génomique comme matrice pour extraire le gène d'intérêt. Le produit de la première PCR est purifié et utilisé comme méga-amorce pour une deuxième PCR avec le plasmide souhaité comme cible. Après l'extension, les surplombs se rejoignent et forment un nouveau plasmide. Le plasmide parental est ensuite dégradé par Dnpi, qui cible les plasmides méthylés synthétisés par les bactéries (Bryksin *et al.*, 2010; Peleg *et al.*, 2014; Unger *et al.*, 2010; van den Ent *et al.*, 2006). Le plasmide peut alors être

utilisé pour la transformation par choc thermique dans des cellules compétentes C43. Une fois dans les cellules compétentes, il peut être surexprimé en culture bactérienne.

### **2.3 Production et purification de TamA et de ses mutants**

La purification de la protéine TamA et de ses mutants se fait en remettant en suspension le culot bactérien suite à l'induction à l'IPTG, puis en lysant les cellules par une méthode telle que la sonication pour libérer le contenu des cellules contenant la protéine désirée. Il est à noter que puisque TamA est une protéine membranaire, sa surface extérieure est hydrophobe. Un détergent est donc ajouté au lysat pour le stabiliser dans le tampon. Les détergents contiennent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Ils forment des micelles lorsque leur concentration est supérieure à la concentration micellaire. Les micelles sont des sphères dont les têtes hydrophiles se trouvent à la surface et les queues hydrophobes à l'intérieur. Ces micelles protègent TamA de la plupart des tampons utilisés dans cette étude puisqu'ils sont à base d'eau. Des détergents sont donc utilisés pour le reste de la purification.

Le lysat est ensuite centrifugé pour culotter les débris cellulaires. Le surnageant qui contient la protéine soluble est filtré pour éliminer les petits débris cellulaires restants. Le lysat est incubé avec la résine Ni-NTA qui est composée d'agarose en bille dérivatisée avec de l'acide nitriloacétique (NTA) chargé d'ions nickel. L'étiquette polyhistidine se lie aux ions de nickel pendant l'incubation. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne et le liquide a pu s'écouler. Le liquide qui s'écoule (l'éluat) contient tous les composants qui ne se sont pas liés la résine. Un gradient d'imidazole croissant est utilisé pour éluer la protéine d'intérêt, car l'imidazole entre en compétition avec l'étiquette polyhistidine pour se lier à la résine chargée en métal et déloge les protéines liées.

Une fois que les fractions contenant les protéines libérées sont récupérées, elles sont incubées avec la TEV (Tabacco Etch Virus) protéase pour cliver l'étiquette polyhistidine qui n'est plus nécessaire. Elles sont ensuite purifiées davantage sur une colonne de filtration sur gel pour effectuer une chromatographie d'exclusion de taille. La colonne est composée de silice percée de trous. Les protéines de taille inférieure à celle du trou y pénètrent et leur élution est ralentie. Les pics de protéines pertinents sont récoltés et concentrés au volume souhaité à l'aide d'une unité de filtration centrifuge (Centricon). Celle-ci laisse passer tout ce qui est de taille inférieure à la taille de ses pores à travers son filtre.

## 2.4 Purification des OMPs substrats

L'OMP choisie comme substrat, OmpX, a été préalablement clonée dans le plasmide pET-28a puis transformée dans les cellules compétentes BL21 (DE3) par un autre membre du laboratoire. Cette protéine s'agrège en corps d'inclusion lors de la surexpression, qui doivent être subséquemment solubilisés afin de récupérer les protéines. Les corps d'inclusion sont remis en suspension dans un tampon contenant des dénaturants tels que le guanidinium, puis la solution est soniquée et les débris cellulaires sont culotés. Ce processus est répété en augmentant la concentration du dénaturant à chaque cycle jusqu'à ce que les corps d'inclusion soient entièrement solubilisés. Il a été démontré que le dénaturant n'affecte pas de manière significative la capacité de l'OMP à se replier dans une membrane (Kleinschmidt, 2006).

## 2.5 Préparation des liposomes

Idéalement, nous voulons que le modèle de protéoliposome reproduise le plus fidèlement possible la membrane externe des bactéries à Gram négatif, qui est asymétrique avec un feuillet interne composé de phospholipides et un feuillet externe composé de phospholipides enrichis de LPS. Les phospholipides présents sont le phosphatidylglycérol (PG) et le phosphatidyléthanolamine (PE), ainsi qu'une petite quantité de cardiolipine (Gessmann *et al.*, 2014). Chez *P. aeruginosa*, ces phospholipides contiennent des chaînes acyles dont le nombre d'atomes de carbone varie de 10 à 18 (Benamara *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2010). Bien que des liposomes asymétriques puissent être produits, ils ne sont pas stables pendant une période suffisamment longue pour mener des expériences sur l'activité insertase (Burgess *et al.*, 2008). C'est pourquoi des bicouches lipidiques seront utilisées. Cependant, ces bicouches ne peuvent pas être constituées de phospholipides natifs aux bactéries à Gram négatif car PE provoque une courbure négative (Horne *et al.*, 2020). Pour résoudre ce problème, les bicouches de phosphatidylcholine (PC) qui ont été utilisées pour une variété d'expériences (Burgess *et al.*, 2008) sont diluées avec des lipides de type PG ou PE.

Des études antérieures ont démontré que BamA ne pouvait pas se replier dans des liposomes composés de lipides natifs d'*E. coli*, principalement composés de PE et de PG avec des chaînes d'acyle à 16 carbones. BamA pouvait cependant se replier dans des liposomes composés de PC avec une chaîne acyle à 10 carbones (PC10). Étant donné que TamA est un homologue de BamA et qu'elle présente une grande ressemblance structurelle avec BamA, il est raisonnable de supposer que TamA peut également se replier dans des liposomes ayant la même composition.

Nous avons donc décidé d'utiliser les lipides PC10 (Fig. 2.1) et PE10 (Fig. 2.2) pour préparer les liposomes pour les tests d'insertase.

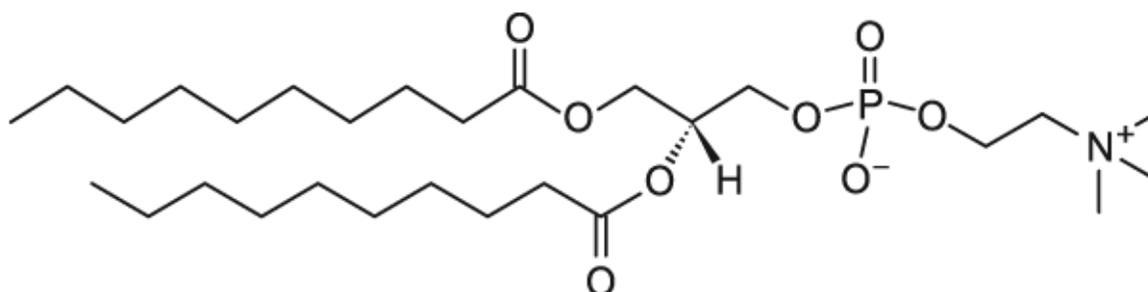


Figure 2.1 : Structure du lipide PC10

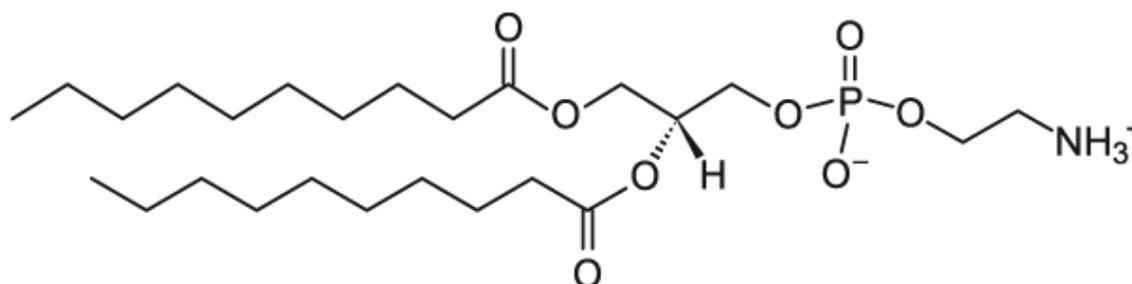


Figure 2.2 : Structure du lipide PE10

Les lipides sont conservés dans du chloroforme, qui doit être éliminé avant de former les liposomes. Les lipides sont séchés sous un courant d'azote, puis les traces de chloroforme restantes sont éliminées en laissant les films lipidiques sous vide pendant une nuit. Les lipides sont remis en suspension dans un tampon approprié et extrudés pour former des vésicules unilamellaires de 100 nm de diamètre.

## 2.6 Test d'activité insertase

Le test d'activité insertase est réalisé en incubant des OMPs dénaturées avec des liposomes. Un échantillon est prélevé immédiatement après l'ajout des OMPs et à des intervalles fixes. La réaction dans les échantillons est interrompue par l'ajout du tampon de chargement SDS-PAGE. Les échantillons sont ensuite migrés sur gel SDS-PAGE sans être chauffés avec un échantillon dénaturé par la chaleur pour servir comme bande témoin pour la protéine entièrement dénaturée. Les liposomes sans TamA sont utilisés pour mesurer le taux de repliement intrinsèque et les

liposomes avec TamA insérée dans la bicouche lipidique sont utilisés pour mesurer le taux de repliement catalysé. Les bandes sont quantifiées à l'aide de logiciels tels que ImageJ.

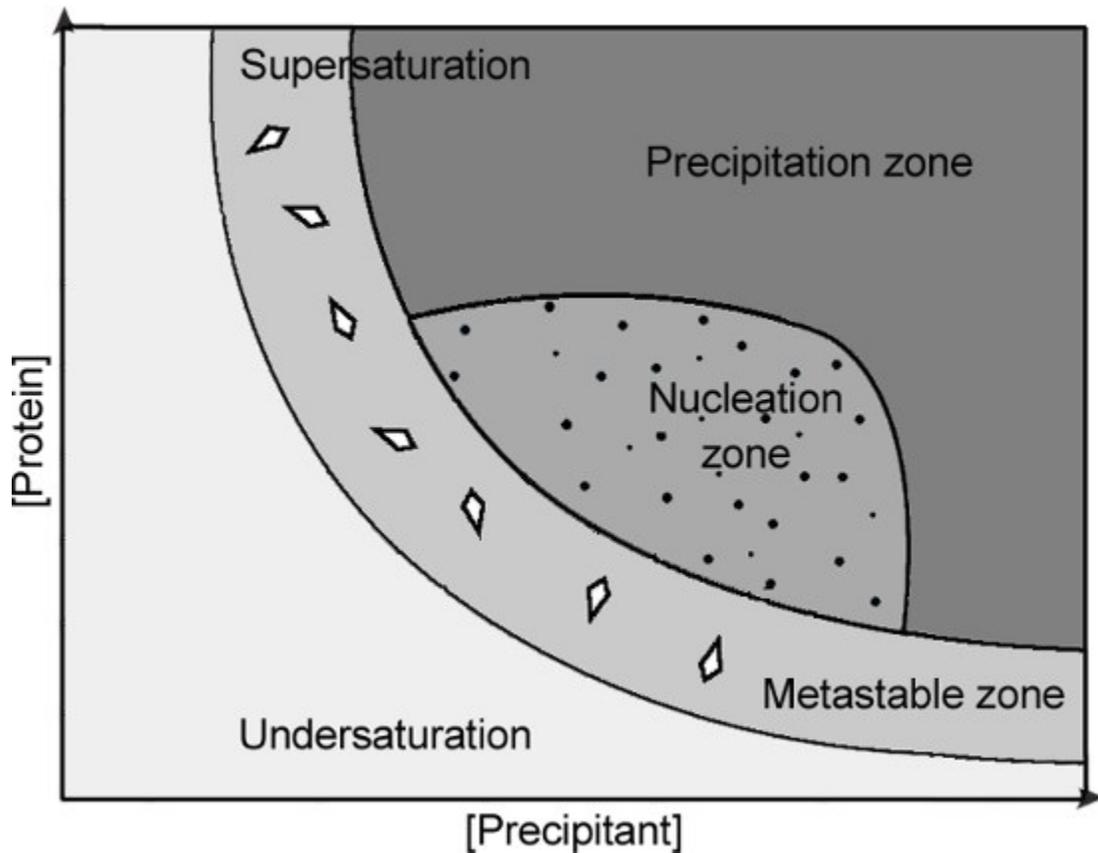
## 2.7 Orientation de la protéine dans le liposome

Un aspect dont nous devons être conscients est l'orientation de TamA après son incorporation dans le liposome, car l'orientation de la protéine dans la bicouche peut influencer la fonction et l'activité de la protéine. Dans cette expérience, nous incubons TamA complète avec des liposomes préformés. Les domaines POTRA sont hydrophiles et suffisamment grands, en théorie, pour ne pas pouvoir traverser les bicouches lipidiques, de sorte que les domaines POTRA sont orientés vers l'extérieur. Cependant, si les protéines étaient mélangées aux lipides avant la formation des liposomes, elles pourraient se retrouver dans les deux orientations et il est donc extrêmement important de déterminer comment les populations sont réparties. Une méthode consisterait à utiliser des protéases si la protéine possède un domaine qui n'est pas intégré dans la membrane. Si cette section est exposée à l'extérieur, elle sera attaquée par la protéase une fois ajoutée et le profil de migration sera différent de celui des échantillons sans protéase (Doerner *et al.*, 2017). Une autre façon de procéder serait de marquer une cystéine sur la section extracellulaire avec une étiquette fluorescente. Ensuite, un quencher non perméable à la membrane comme le TCEP est ajouté au milieu et la fluorescence est mesurée pour la comparer à la fluorescence initiale et calculer la fraction de la protéine qui est orientée vers l'extérieur (Deutschmann *et al.*, 2022).

## 2.8 Cristallographie de TamA avec des substrats lipidiques

Des simulations de la dynamique moléculaire de TamA ont montré qu'elle possède deux résidus arginine conservés dans sa porte latérale qui sont supposés être des sites d'interaction avec les lipides. Notre second but était de vérifier si les arginines interagissent avec les lipides par cristallographie aux rayons X. Pour ce faire, nous devons créer les conditions appropriées pour induire la protéine à sortir de la solution dans une structure ordonnée pour produire un cristal. Cela implique généralement de concentrer la protéine pour atteindre le point de sursaturation, puis de la mélanger avec des précipitants (Smyth *et al.*, 2000). La concentration des précipitants est modifiée jusqu'à ce que le mélange atteigne la zone de nucléation et que des cristaux se forment (Fig. 2.3). La diffusion de vapeur est l'une des méthodes utilisées pour atteindre cet objectif. La solution de protéine est soit une goutte assise, soit une goutte suspendue qui s'équilibre contre un réservoir contenant des agents cristallins dont la concentration est

supérieure ou inférieure à celle de la goutte. Les conditions de cristallisation de TamA (en absence de ligand) sont déjà connues.



**Figure 2.3 : Diagramme de phase d'une expérience de cristallisation de protéines.** Les cristaux ne peuvent se former que lorsque la protéine est sursaturée. La nucléation a lieu dans la zone de nucléation et la croissance des cristaux dans la zone métastable. Lorsqu'une protéine est sous-saturée, la goutte reste claire. Figure tirée de (Pichlo *et al.*, 2016)

Une fois les cristaux produits, ils sont pêchés à l'aide de boucles spécialisées, congelés dans de l'azote liquide pour les préserver et envoyés au synchrotron. Le synchrotron est un gigantesque accélérateur de particules qui accélère des électrons générés, ce qui produit du rayonnement synchrotron. Les faisceaux lumineux sont captés pour frapper les cristaux de protéines. Au moment de l'impact, la lumière est déviée d'une manière particulière en fonction de la structure de la protéine et des données de diffraction sont générées, qui peuvent ensuite être utilisées pour résoudre la structure d'une protéine à l'aide d'un logiciel spécialisé.

La formation de particules de glace pourrait endommager les cristaux de protéines et empêcher le synchrotron de prendre des mesures précises. Par conséquent, si les cristaux sont susceptibles d'être endommagés par la glace, ils sont cultivés dans des conditions contenant un

cryoprotectant ou un cryoprotectant est ajouté pendant la pêche avant l'étape de congélation instantanée afin de les protéger pendant le transport.

## 2.9 Co-cristallisation

Ici, nous voulons observer des cristaux de TamA en présence de lipides pour voir si et comment ils interagissent. A partir des conditions connues de cristallisation, deux méthodes sont disponibles pour cristalliser TamA en présence de ligands de phospholipides : la co-cristallisation et le trempage des cristaux. La co-cristallisation consiste à incuber la protéine avec le substrat souhaité et à tenter de cristalliser le mélange obtenu. Le trempage de cristaux consiste à prendre un cristal de protéine cultivé en absence de ligand et de le tremper dans une solution de ligand (qui peut diffuser dans le cristal) avant de l'envoyer au synchrotron.

Nous nous intéressons aux lipides présents dans l'environnement natif de TamA, la membrane externe. La membrane externe de *P. aeruginosa* contient du PE, du PG et de la cardiolipine avec des chaînes d'acyle allant de 12 à 18 atomes de carbone (Benamara *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2010). Nous avons donc choisi le PG14 (Fig. 2.4), un phospholipide présent dans la membrane externe, comme l'un des lipides pour l'expérience. Le PG14 est conservé dans du chloroforme, qui peut dénaturer les protéines. Pour utiliser le PG14 dans nos expériences, il est donc nécessaire d'éliminer le chloroforme. Ceci peut être réalisé en évaporant le chloroforme en utilisant la même méthode que pour la préparation des liposomes. Les films lipidiques obtenus peuvent alors être remis en suspension pour être utilisés. Le Lyso PG14 (Fig. 2.5) a également été sélectionné pour cette expérience. Le Lyso PG14 est similaire à PG14, mais possède une queue aliphatique en moins. Cette modification rend la molécule soluble dans l'eau et lui permet d'agir comme un détergent.

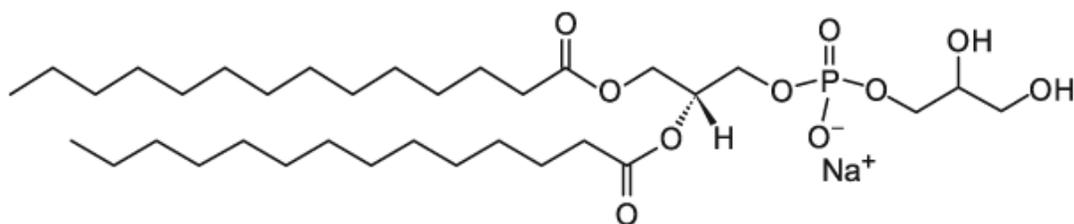
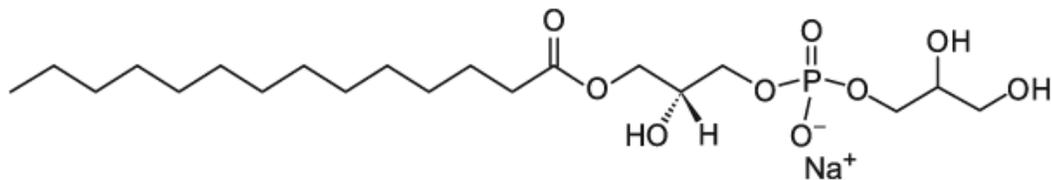


Figure 2.4 : Structure de PG14



**Figure 2.5 : Structure de Lyso PG14**

La co-cristallisation a été la première méthode tentée, mais comme indiqué précédemment, la purification des TamA nécessite l'utilisation de détergents puisqu'il s'agit de protéines membranaires. Par conséquent, pour améliorer les chances d'obtenir une interaction entre les TamA et le ligand, nous utilisons des micelles mixtes de détergents et de lipides. Nous voulons maximiser la quantité de ligand disponible et donc maximiser la proportion de lipides par rapport au détergent dans la micelle mixte.

## **2.10 Détermination du rapport lipide/détergent maximale dans les micelles mixtes**

La remise en suspension des films de PG14 conduit à une solution trouble qui devient plus transparente lorsqu'on ajoute du détergent. Cette propriété est utilisée pour déterminer la quantité minimale de détergent nécessaire pour incorporer la totalité d'une quantité donnée de lipides, puisque la solution s'éclaircit à mesure que l'on ajoute du détergent. L'objectif étant de saturer les micelles en phospholipides pour favoriser leurs interactions avec TamA.

Un gradient de détergent a été ajouté à la même quantité de lipides. L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée pour tracer la courbe et déterminer la quantité minimale de détergent nécessaire pour incorporer une quantité donnée de lipides. Le même rapport lipide/détergent que celui déterminé pour le PG14 est utilisé pour Lyso PG14 de manière à pouvoir facilement comparer ces conditions.

## **2.11 Trempage de cristaux**

Le trempage des cristaux est la deuxième méthode disponible. Le protocole consiste à immerger un cristal mature dans une solution de ligands. De 40 à 70 % des cristaux de protéines sont constitués d'eau, de sorte que de larges canaux traversent généralement la structure cristalline des protéines et que de petites molécules peuvent y diffuser (Wienen-Schmidt *et al.*, 2021). Les cristaux natifs de TamA sont récoltés puis brièvement trempés dans une solution contenant le ligand d'intérêt avant d'être envoyés au synchrotron. Le trempage des cristaux pourrait

endommager les cristaux à cause du changement d'environnement. Il faudrait donc effectuer des essais pour vérifier que les cristaux natifs peuvent conserver leur intégrité.

### 3 Matériels et méthodes

---

#### 3.1 PCR

Les réactions PCR sont effectuées en utilisant le "Q5® High-Fidelity 2X Master Mix" de New England Biolabs (NEB). Une réaction PCR d'amplification typique se compose de 0.02 U/μL de polymérase Q5 (NEB), 1X de tampon de réaction Q5 (NEB), 0.5 μM d'amorces sens et anti-sens, au moins 100 ng d'ADN matrice et 200 μM de mélange de dNTPs et complétée jusqu'à un volume final de 50 μL avec de l'eau milliQ filtrée. Si les séquences d'amorces sont riches en GC, 1X de tampon Q5 High GC Enhancer (NEB) sont ajoutés au mélange pour faciliter la réaction. Les réactions PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (Bio-rad). Le programme d'amplification PCR comprenait une étape de dénaturation initiale à 98 °C pendant 30 secondes, suivie de 35 cycles de dénaturation (98 °C, 10 secondes), d'appariement (température de fusion des amorces, 30 s) et d'élongation (72 °C, 30 s/kb) avec une étape d'extension finale (72 °C, 2 min).

**Tableau 3.1 : Amorces utilisées dans cette étude**

Nom	Séquence	Température de fusion (°C)
TamA R286A_R288A sens	GACGTCGGGGCGGCCGCGCGTTCAACTGGACCCGC	63
TamA R286A_R288A anti-sens	GCGGGTCCAGTTGAACGCCGCGGCCGCCCGACGTC	63
TamA R286D_R288D sens	GACGTCGGGGCGGACGCGGACTTCAACTGGACCCGC	63
TamA R286D_R288D anti-sens	GCGGGTCCAGTTGAAGTCCGCGTCCGCCCGACGTC	63
BamA EC sens	ACCTGTATTTTCAGGGATCCTTCGTAGTGAAAGATATTCATTTTC	58
BamA EC anti-sens	GGTGGTGGTGCTCGAGTTACCAGTTTTACCGATG	59
BamA PA sens	GAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCGAGTCCTTCACTGTTTC	63
BamA PA anti-sens	GGTGGTGGTGCTCGAGTCAGAAGGTCTGGCCC	63

### 3.2 Milieux de culture

Le milieu LB est fabriqué en mélangeant 10 g de tryptone en poudre, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl pour 1 litre d'eau avant d'être stérilisé dans un autoclave.

Le milieu 2YT est fabriqué en mélangeant 16 g de tryptone en poudre, 10 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl pour 1 litre d'eau avant d'être stérilisé dans un autoclave.

### 3.3 Transformation

1 µL de plasmide purifié ou 10 µL de produit de réaction PCR est ajouté à un tube contenant 100 µL de cellules compétentes (BL21 (DE3), BL21 star (DE3), C41 ou C43) et laissé sur la glace pendant 30 minutes. Les tubes sont soumis à un choc thermique à 42 °C pendant 50 secondes. Après un repos de 2 minutes sur la glace, 150 µL de milieu LB sont ajoutés aux tubes et laissés à incuber à 37 °C sous agitation à 600 rpm pendant 1 heure. Des plaques d'agar LB contenant la concentration d'antibiotique appropriée sont inoculées et laissées à incuber à 37 °C pendant la nuit. Les plaques sont ensuite conservées à 4 °C.

Les cellules compétentes appropriées dépendent des exigences spécifiques. Le système d'expression du bactériophage T7 est fréquemment utilisé pour la surexpression de protéines procaryotes et eucaryotes (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). *Escherichia coli* BL21 (DE3) est une souche fréquemment utilisée en raison de sa croissance cellulaire rapide dans des milieux minimaux, de sa faible production d'acétate lorsqu'elle est cultivée sur des niveaux élevés de glucose, de sa faible abondance en protéases et de sa capacité à être cultivée à haute densité (Kim *et al.*, 2017). BL21 Star (DE3) est une souche mutante de BL21 (DE3) qui présente une mutation renforçant la stabilité de l'ARN messenger, ce qui améliore la stabilité de l'expression des protéines (Jiang *et al.*, 2021).

La surexpression des protéines membranaires peut être toxique pour la cellule, ce qui peut réduire la quantité produite et même entraîner la mort de la cellule. Deux souches mutantes d'*E. coli* BL21(DE3), connues sous les noms de C41 et C43, sont couramment utilisées pour atténuer les effets de la toxicité associée à la surexpression de protéines recombinantes (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). Le mutant C41 a été sélectionné à partir d'un petit nombre de BL21 (DE3) survivants capables de résister à la toxicité. Cependant, la surexpression de certaines protéines membranaires entraîne toujours une toxicité dans la souche C41. Par conséquent, des mutants résistants à cette toxicité ont à nouveau été sélectionnés et sont devenus C43 (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004; Miroux *et al.*, 1996).

### **3.4 Électrophorèse sur gel d'agarose**

Les échantillons sont mélangés avec le colorant d'ADN Eco-Green-DNA Dye 6X (Bio Basic) dans un rapport 1:5 avant d'être déposés sur un gel d'agarose à 1 %. Le gel d'agarose est préparé en chauffant 500 mg d'agarose avec 50 mL de tampon TAE (40 mM Tris base, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA). Le mélange est ensuite versé dans un moule et refroidi. Les échantillons migrent dans le tampon TAE à 110 V pendant environ une heure avant d'être numérisés avec le système gel doc XR+ (Bio-Rad).

### **3.5 Test d'expression de BamA dans différentes cellules compétentes**

BamA a été transformé dans plusieurs cellules compétentes différentes comme décrit ci-dessus à la section 3.3. Cinq colonies de chaque plaque ont été cultivées dans 200 mL de LB. Les cultures sont induites avec 0.5 mM IPTG lorsque DO600 atteint 1 et laissées à croître pendant la nuit à 30 °C. Les cellules sont récoltées et remises en suspension dans 20 mM HEPES, 200 mM NaCl pH 8 auxquels 0.2 % elugent est ajouté. Les cellules sont lysées par sonication (1 min, puissance 8) et un échantillon du lysat est prélevé. Les débris cellulaires sont ensuite culotés par centrifugation (30 min, 4 °C, 24000 g) et le surnageant est filtré avec un filtre de MCE 0.8 µm (MF-Millipore). Les échantillons de lysats et de surnageants de chaque cellule compétente migrent sur des gels SDS-PAGE.

### **3.6 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE**

Les échantillons sont mélangés avec du tampon de chargement Laemmli 4X + β-mercaptoéthanol dans un rapport 1:3 avant d'être chauffés à 90 °C pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite chargés avec un marqueur de poids moléculaire (1X Precision Plus Dual Colors; Bio-Rad) dans un gel SDS-PAGE à 12 %. Les échantillons ont migré dans un tampon Tris-glycine (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) pendant 40 minutes à 250 V et 0.09 A par gel. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie, puis décolorés dans l'eau.

### **3.7 Western blot**

Après électrophorèse sur gel SDS-PAGE, les protéines et le marqueur de poids moléculaire ont été transférés du gel sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse à 100 V et 0.5 A pendant 1 h 20 min. Le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.025 % SDS, 20 % méthanol, pH 8.3) est maintenu au froid à l'aide d'un accumulateur de froid. Après le transfert, la membrane a été bloquée avec un tampon de blocage composé du tampon TBST (20 mM Tris,

150 mM NaCl, 0.01 % Tween, pH 7,6) avec 5 % de lait écrémé pendant 2 heures à température ambiante. La membrane de nitrocellulose a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire Anti-His<sub>6</sub> de souris IgG<sub>1</sub> (Roche Life Sciences) (1:1000) pendant une nuit à température ambiante avec agitation. La membrane a ensuite été lavée plusieurs fois dans du TBST avant d'être incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris produit chez le lapin (Sigma-Aldrich) (1:2500) pendant 1 heure en agitant à température ambiante. La membrane a de nouveau été lavée plusieurs fois dans du TBST avant d'être recouverte avec 2 mL de Immobilon Classico Western HRP substrate et numérisée sur le gel doc en mode chimiluminescence.

### **3.8 Production et purification de TamA et de ses mutants**

Le gène TamA de *P. aeruginosa* a été cloné dans le plasmide pET-20b. Le plasmide a ensuite été transformé dans des cellules compétentes C43 par choc thermique. TamA avec étiquette polyhistidine a été surexprimée à partir de cellules C43 par induction avec 0.5 mM IPTG lorsque DO600 atteint 1 et cultivé pendant une nuit à 30 °C dans le milieu de culture 2YT avant d'être récoltée. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 8. Il est supplémenté avec du lysozyme à 15 mg/mL, de la DNase à 1 mg/mL, du MgCl<sub>2</sub> à 1 M et 1 % elugent avant d'être lysé par sonication. Les débris cellulaires ont été culottés. Le surnageant a été filtré avec un filtre MCE de 0.8 µm (MF-Millipore) et incubé avec 5 mL de résine Ni-NTA pendant une heure avant d'être appliqué sur une colonne (Econo-Column Chromatography Columns 2.5 x 20; Bio-Rad). Les protéines sont ensuite éluées sur un gradient d'imidazole de 0 à 500 mM. Le détergent à cette étape a été remplacé par du C8E4. Les protéines ont été incubées avec la protéase TEV pendant une nuit à température ambiante avant d'être concentrées à l'aide d'un centricon 100 kD et purifiées davantage par chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200 10/300). Les échantillons combinés de TamA ont été concentrés une fois de plus et conservés pour une utilisation ultérieure.

### **3.9 Production et purification de OmpX**

Le gène de OmpX a été cloné dans le plasmide pET-28a. Le plasmide a ensuite été transformé dans des cellules BL21 (DE3) compétentes par choc thermique. OmpX a été surexprimé à partir de cellules BL21 (DE3) par induction avec 1 mM IPTG lorsque DO600 atteint 2 et cultivées pendant 3 h à 37 °C dans du milieu 2YT. Les cellules sont récoltées et le culot est remis en suspension dans 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 8 supplémenté avec du lysozyme à 15 mg/mL, de la DNase à 1 mg/mL, du MgCl<sub>2</sub> à 1 M avant d'être lysées par sonication. Le lysat est

centrifugé pour éliminer le surnageant et les corps d'inclusion sont remis en suspension dans 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.5 M guanidinium, pH 8. La solution est laissée sur la glace pendant 10 minutes avant d'être soniquée puis centrifugée à nouveau pour éliminer le surnageant. Le processus est répété en augmentant la concentration de guanidinium de 0.5 M à chaque cycle. Les corps d'inclusion sont complètement solubilisés à une concentration de guanidinium de 3M. Les corps d'inclusion solubilisés ont été appliqués sur une résine de Q sépharose pour une purification supplémentaire. L'éluat a été récupéré et conservé.

### **3.10 Préparation des liposomes**

Les lipides conservés dans le chloroforme ont été séchés sous un léger courant d'azote pour former une fine pellicule dans des tubes de verre. Les films de lipides ont été maintenus sous vide pendant une nuit pour éliminer les solvants résiduels. Les films lipidiques ont été reconstitués dans un tampon contenant 2 mM d'EDTA et 10 mM de borate à pH 10. Les liposomes ont été produits en extrudant onze fois les lipides reconstitués à travers un filtre de 0.1  $\mu\text{m}$ . Les lipides utilisés étaient PC10 (Fig. 2.1) et PE10 (Fig. 2.2) d'Avanti Polar Lipids.

### **3.11 Test de l'activité insertase**

Ce test d'activité insertase a été conçu pour comparer les effets catalytiques de TamA et de ses mutants sur le repliement des OMPs substrats, tel que OmpX, au cours du temps. Tout d'abord, le taux de repliement intrinsèque, qui sert de contrôle négatif, est mesuré en incubant l'OMP substrat avec des liposomes sans TamA puis en surveillant la quantité d'OMPs repliées au cours du temps. Le taux de repliement catalysé, quant à lui, est mesuré en incubant l'OMP substrat avec des liposomes contenant TamA dans sa bicouche lipidique.

Pour mesurer la vitesse intrinsèque de repliement de l'OMP, l'OMP dénaturée par le guanidinium a été ajoutée à un échantillon de liposome dans un tampon borate (2 mM EDTA, 10 mM borate, pH 10) pour une concentration finale de 4  $\mu\text{M}$  d'OMP et de 3.2 mM de liposomes. Les réactions de repliement ont été incubées à température ambiante et des échantillons ont été prélevés à des intervalles de temps compris entre 0 et 200 minutes et un échantillon supplémentaire a été prélevé après 48 heures. La réaction de repliement a été interrompue par l'ajout d'un tampon de chargement SDS-PAGE 4X et les échantillons ont été conservés sur de la glace. Les échantillons ont ensuite migré et ont été comparés avec un échantillon bouilli sur un gel SDS-PAGE (contrôle 100% dénaturé).

Pour mesurer le taux de repliement catalysé par TamA, 4  $\mu\text{M}$  de TamA ont été incubés avec 4  $\mu\text{M}$  de liposomes pendant 2 heures à température ambiante sous agitation constante. Cette procédure incorpore TamA dans les liposomes avec les protéines dont le domaine périplasmique est orienté vers l'extérieur. Le test de l'insertase se déroule de la même manière que pour le repliement intrinsèque.

### **3.12 Détermination de la quantité minimale de détergent nécessaire à l'incorporation du PG14 dans les micelles mixtes**

Des films minces de PG14 ont été préparés en utilisant la même méthode que celle décrite à la section 3.10. Les films lipidiques ont été reconstitués dans un tampon contenant 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 8. 100 % de C8E4 a été dilué en série de moitié à chaque fois. Le même volume de chaque dilution est ajouté à des tubes contenant 10 mM de PG14 reconstitué. L'absorbance à 600 nm des échantillons est mesurée à l'aide d'un NanoDrop (ThermoFisher) et tracée pour déterminer le point d'inflexion correspondant à la quantité minimale de détergent nécessaire pour solubiliser les lipides.

### **3.13 Cristallisation de TamA**

TamA purifiée a été concentrée à 10-20 mg/mL grâce à un centricon de 100 kD. La cristallisation a été réalisée par la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise ou en goutte suspendue dans une plaque Intelli-plate 24-4 (Art Robbins Instruments) ou une plaque VDXm avec un scellant, respectivement. Les gouttes de cristallisation ont été préparées avec un rapport protéine/réservoir de 1 :1 ou 1 :1.5, en mélangeant 1  $\mu\text{L}$  de protéine avec 1  $\mu\text{L}$  ou 1.5  $\mu\text{L}$  de solution de réservoir. Les gouttes ont été équilibrées contre 350  $\mu\text{L}$  de solution réservoir pour les plaques de gouttes assises et 450  $\mu\text{L}$  de solution réservoir pour les plaques de gouttes suspendues. La solution de réservoir comprenait HEPES (0.07M, pH 6.8 – 7.4),  $\text{MgCl}_2$  (0 – 0.15 M), PEG 4000 (9 – 17.5 %) et isopropanol (1 – 8 %). Les cristaux ont été récoltés à l'aide de microboucles en nylon, puis refroidis rapidement et conservés dans l'azote liquide avant la collecte des données de diffraction au synchrotron. Si nécessaire, un cryoprotectant est ajouté directement à la goutte de cristal ou en trempant le cristal récolté dans le cryoprotectant (approx. 20 % glycérol). Les données ont été recueillies au Canadian Light Source.

### **3.14 Co-cristallisation of TamA**

La co-cristallisation est réalisée en introduisant une étape supplémentaire au protocole de purification de TamA décrite précédemment à la section 3.8. Après l'élimination de l'étiquette polyhistidine par la protéase TEV, la solution de TamA est incubée pendant une nuit avec du tampon (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 8) contenant 0.5 % de micelles mixtes de C8E4 avec PG14 ou Lyso PG14 à un volume dix fois supérieur à celui de la solution protéique. La protéine est ensuite concentrée et purifiée par chromatographie d'exclusion de taille. Il convient de noter que le tampon contenant les micelles mixtes est utilisé pour le reste de la purification. Le mélange résultant est ensuite utilisé pour la cristallisation tel que décrit dans la section 3.13.

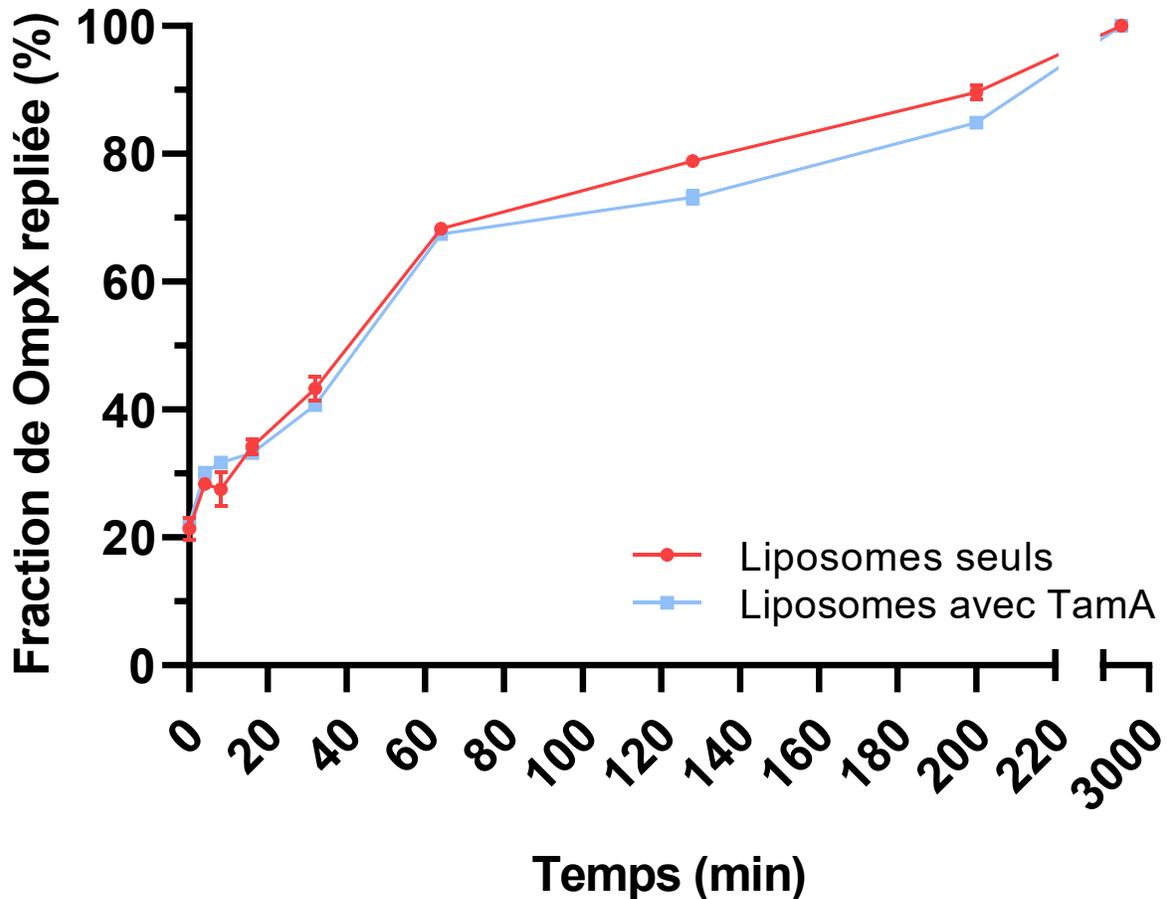
## 4 Résultats

---

### 4.1 Mesure de l'activité insertase de TamA et de ses mutants

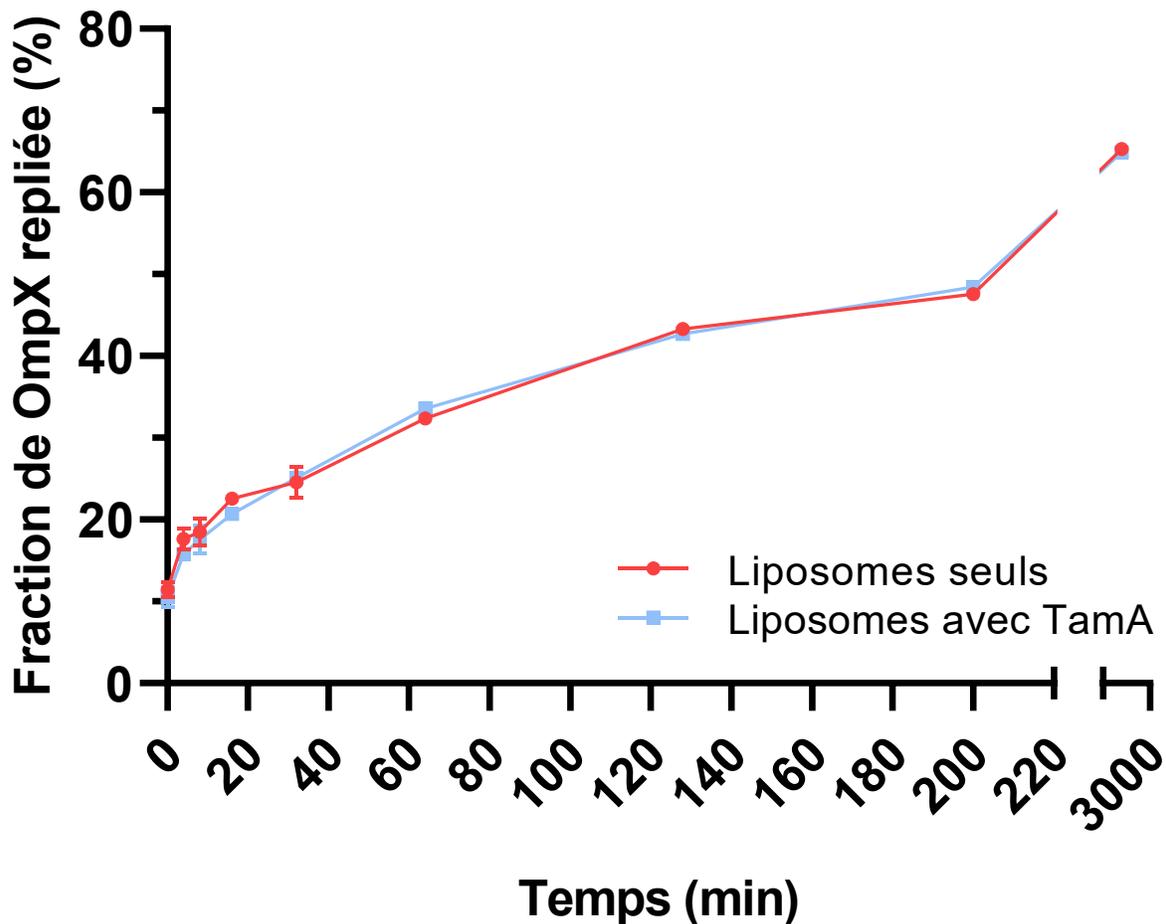
Notre premier objectif était de déterminer l'importance des arginines conservées pour l'activité insertase de TamA. Les mutants TamA R286A\_R288A et TamA R286D\_R288D ont été obtenus par clonage RF. Ensuite, 4  $\mu$ M d'OmpX dénaturée ont été mélangés avec 3.2 mM de liposomes composés de 100 % PC10 avec ou sans 4  $\mu$ M de TamA et des échantillons ont été prélevés immédiatement et à intervalles réguliers jusqu'à ce que 200 minutes se soient écoulées. Les échantillons ont été visualisés sur des gels SDS-PAGE. Les liposomes sans TamA ont été utilisés pour mesurer le taux de repliement intrinsèque et TamA a été incubé avec des liposomes pour observer le taux de repliement catalysé.

Dans les gels de liposomes sans TamA, la bande d'OmpX repliée migre plus lentement que la bande OmpX non repliée (Fig. 8.2 et 8.3). Le profil du repliement des OmpX est le même pour les liposomes incubés avec TamA (Fig. 4.1 et 8.2). Au bout de 40 minutes, environ la moitié des OmpX sont repliées. Ce résultat contredit l'hypothèse selon laquelle TamA facilite le repliement des protéines parce qu'il partage une ressemblance structurelle avec BamA (Bamert *et al.*, 2017; Plummer *et al.*, 2015). Cela démontre également la difficulté de faire la distinction entre l'insertion spontanée de petites porines dénaturées dans des membranes lipidiques et l'insertion catalysée par les complexes BAM et TAM. Il est reconnu que l'insertion spontanée d'OmpX et d'autres OMPs est inhibée par des bicouches épaisses, des vésicules de grande taille et l'ajout de phospholipides tels que PE qui induit une courbure négative (Burgess *et al.*, 2008; Horne *et al.*, 2020). Différentes compositions lipidiques ont donc été testées pour limiter l'insertion spontanée.



**Figure 4.1 : Taux de repliement d'OmpX dans des liposomes 100 % PC10 avec et sans TamA.** 4  $\mu$ M d'OmpX dénaturée ont été mélangés avec 3.2 mM de liposomes composés de 100 % PC10 avec ou sans 4  $\mu$ M de TamA. La fraction d'OmpX repliée est représentée en fonction du temps, les cercles rouges et les carrés bleus indiquant le repliement en absence et en présence de TamA, respectivement. Ces courbes montrent une absence de changement dans le taux de repliement lors de l'incorporation de TamA dans les liposomes. Certaines barres d'erreur sont si petites qu'elles sont cachées par les points de données.

Le protocole a été répété avec des liposomes composés de 80 % PC10 + 20 % PE10 pour vérifier si la composition lipidique des liposomes affecte la vitesse de repliement des OMPs, ainsi que l'activité de TamA. La vitesse de repliement d'OmpX demeure inaltérée par l'ajout de TamA aux liposomes dans ce cas. Par contre, le repliement intrinsèque a été ralenti, nécessitant 200 minutes pour que la moitié des OmpX soit repliée, par rapport à 40 minutes pour les liposomes composés de 100 % PC10 (Fig. 4.2 et 8.3). Ce résultat est attendu en raison de l'ajout de PE aux liposomes, qui, comme mentionné précédemment, inhibe l'insertion spontanée des OMPs (Burgess *et al.*, 2008; Horne *et al.*, 2020).

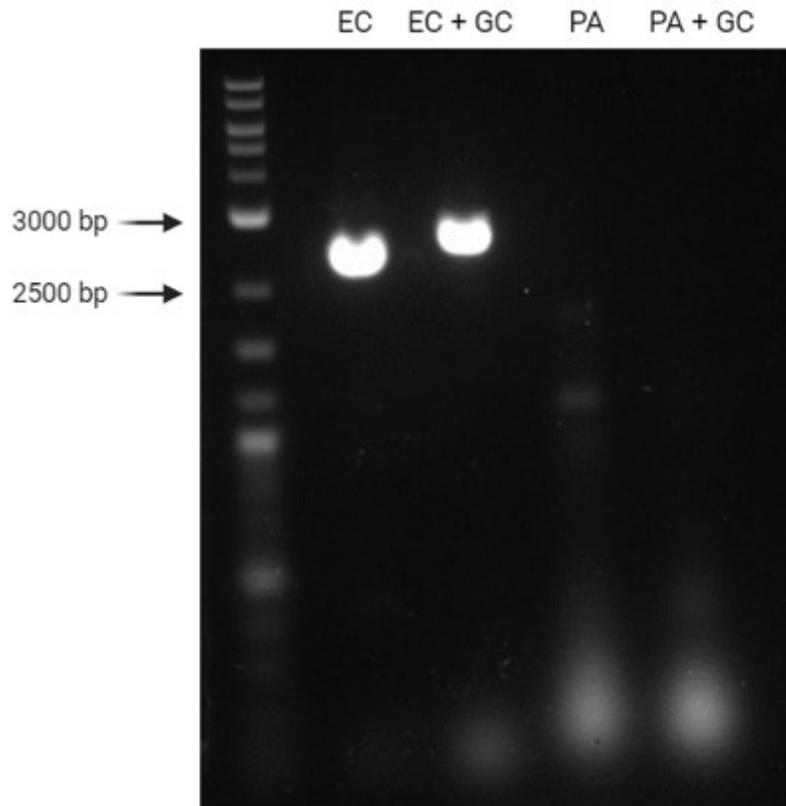


**Figure 4.2 : Taux de repliement d'OmpX dans des liposomes 80 % PC10 + 20 % PE10 avec et sans TamA.** 4  $\mu$ M d'OmpX dénaturé ont été mélangés avec 3.2 mM de liposomes composés de 80 % PC10 + 20 % PE10 avec ou sans 4  $\mu$ M de TamA. La fraction d'OmpX repliée est représentée en fonction du temps, les cercles rouges et les carrés bleus indiquant le repliement en absence et en présence de TamA, respectivement. Ces courbes montrent une absence de changement dans le taux de repliement lors de l'incorporation de TamA dans les liposomes. Certaines barres d'erreur sont si petites qu'elles sont cachées par les points de données.

Il était prévu que l'ajout de TamA sauvage aux liposomes catalyserait le repliement d'OmpX et que les essais avec les versions mutantes de TamA révéleraient les effets de ces mutations sur l'activité insertase de TamA. Cependant, étant donné l'absence d'effet observé lors de l'inclusion de TamA de type sauvage, nous n'avons pas de point de comparaison pour un repliement catalysé. L'essai n'a donc pas été réalisé avec les mutants.

## 4.2 Clonage de BamA

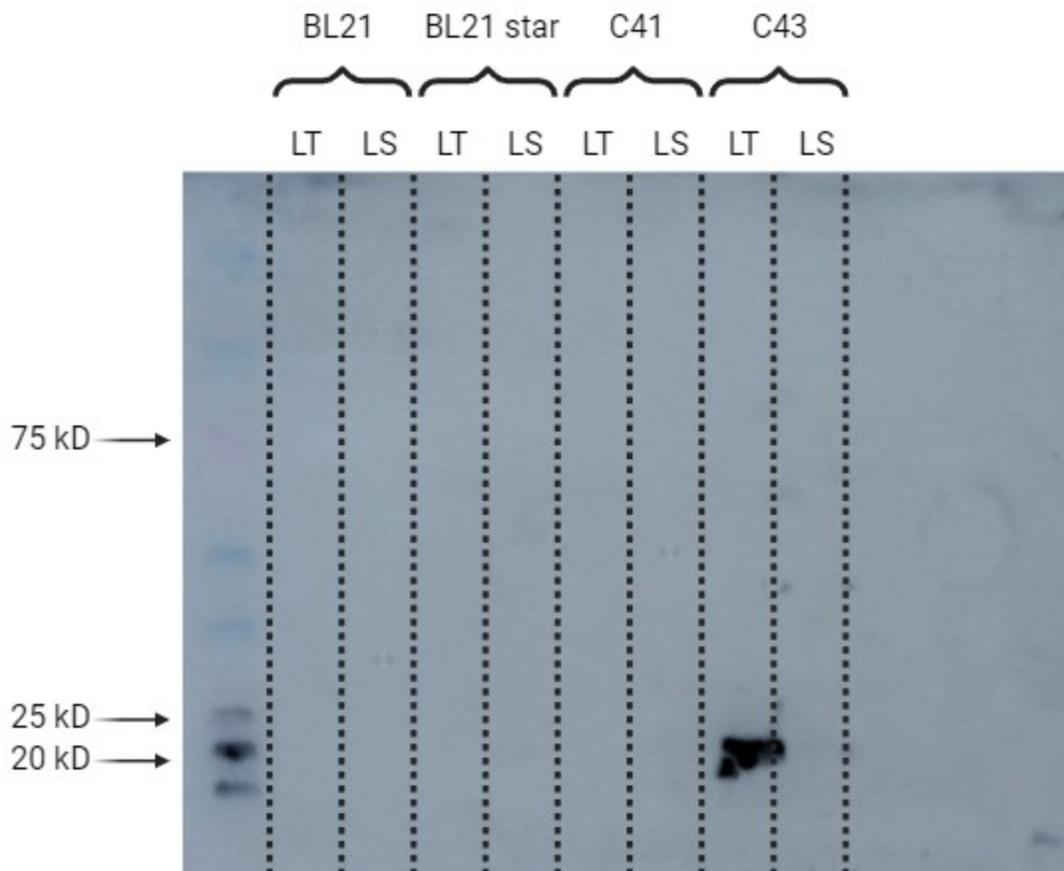
Ensuite, pour s'assurer que l'essai fonctionnel est opérationnel, nous avons décidé d'inclure BamA comme contrôle positif. Nous avons d'abord utilisé le clonage RF pour extraire le gène BamA des génomes de *E. coli* et de *P. aeruginosa*. Un gel d'agarose à 1 % a été utilisé pour vérifier l'extraction du gène. Seul le gène de BamA de *E. coli* a pu être cloné par une réaction PCR classique et par une réaction PCR auquel le tampon "High GC Enhancer" a été ajouté pour faciliter la réaction. Leur longueur est d'environ 2500 et 2800 paires de bases respectivement (Fig. 4.3). Comme la longueur de BamA est de 2430 paires de bases (Albrecht *et al.*, 2014), le produit de la réaction PCR classique est utilisé comme méga-amorce pour la deuxième PCR après purification. La séquence est ensuite vérifiée par séquençage Sanger.



**Figure 4.3 : Extraction du gène de BamA.** Le gène BamA a été extrait à partir de l'ADN génomique d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* à l'aide d'amorces spécifiques par clonage RF. Certaines réactions PCR ont été supplémentées avec le tampon "High GC Enhancer". Les échantillons ont été mélangés avec le colorant Green-DNA avant d'être déposés sur un gel d'agarose à 1 %. Une échelle de 1 kb (NEB) a été utilisée. Le gel a été visualisé à l'aide de gel doc XR+ (Bio-Rad). Les échantillons sont : EC = BamA de *E. coli*; EC+GC = BamA de *E. coli* avec le tampon "High GC Enhancer"; PA = BamA de *P. aeruginosa*; PA+GC = BamA de *P. aeruginosa* avec le tampon "High GC Enhancer".

Ensuite, le gène cloné de BamA dans son plasmide d'expression a été transformé dans les souches de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 Star (DE3), C41 et C43 pour déterminer quelles cellules compétentes produisent le plus de BamA. Étant donné que BamA est une protéine membranaire, sa surexpression est potentiellement toxique pour les cellules hôtes. Par conséquent, la surexpression dans BL21 (DE3) et BL21 Star DE3) est peu probable et, même si BamA est produite, ce sera vraisemblablement en petites quantités. Cependant, comme C41 et C43 sont tolérants à la toxicité, ils devraient exprimer BamA. La production dans la souche C43 devrait être meilleure en raison de sa plus grande résistance à la toxicité.

BamA a été surexprimé puis les cellules ont été récoltées, remises en suspension et lysées par sonication. Les surnageants filtrés et le lysat total de chaque transformation ont été analysés sur un gel SDS-PAGE afin de déterminer celle qui produit le plus de BamA. Les bandes de protéines après surexpression n'étaient pas visibles avec la coloration au bleu de Coomassie donc un western blot a été réalisé pour détecter si BamA était présente. Pour visualiser les résultats, nous avons utilisé un anticorps Anti-His6 de souris IgG1 suivi d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris produit chez le lapin. Seul l'échantillon de lysat complet par les protéines produites dans C43 a produit une bande (Fig. 4.4). Cependant, cette bande est mal définie et son poids est inférieur à celui de BamA dont le poids est de 88 kDa (Morgado *et al.*, 2015).



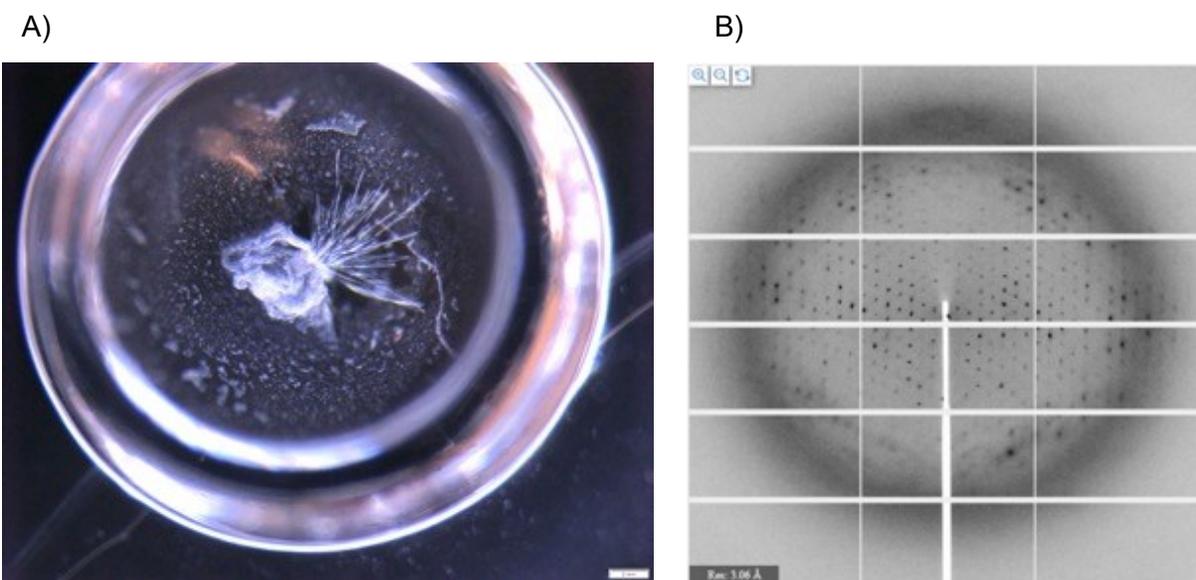
**Figure 4.4 : Test d'expression de BamA.** BamA d'*E. coli* a été transformée dans les cellules compétentes BL21 (DE3), BL21 Star (DE3), C41 et C43. Les cellules bactériennes ont ensuite été cultivées, culottées et lysées. Un Western blot a été réalisé en utilisant le lysat total (LT) et le lysat soluble (LS) de chaque cellule compétente. Les échantillons ont été traités avec l'anticorps primaire Anti-His<sub>6</sub> de souris IgG<sub>1</sub> puis l'anticorps secondaire anti-IgG de souris produit chez le lapin, et ensuite visualisés avec le Gel Doc en mode chimiluminescence en utilisant la solution Immobilon Classico Western HRP substrate.

### 4.3 Vérification des anciennes conditions de cristallisation de TamA

Notre deuxième but était d'obtenir des cristaux de TamA interagissant avec des lipides afin de vérifier que les arginines dans la porte latérale agissent comme des sites de liaison aux phospholipidiques. Des cristaux de TamA ont été obtenus précédemment par un autre membre du laboratoire, les conditions de cristallisation de TamA en l'absence de ligand sont donc connues. Afin d'évaluer si ces anciennes conditions d'optimisation sont applicables à notre préparation de TamA, la protéine TamA purifiée est concentrée à 15 mg/mL puis mélangée avec des précipitants dans des gouttes assises et des plaques de gouttes suspendues. Les cristaux choisis sont apparus dans la condition contenant 12 % PEG 4000, 2 % Isopropanol, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>

et 0.07 M HEPES pH 7.2 dans une goutte suspendue avec un rapport de 1:1.5 TamA/solution du réservoir. Ils sont en forme d'aiguilles et se sont regroupés en amas (Fig. 4.5A). Il est donc difficile d'isoler et de récolter un seul cristal sans casser les cristaux voisins, ce qui limite le nombre de cristaux disponibles.

Les cristaux natifs diffractent jusqu'à 2.8 Å (Fig. 4.5B). Cependant, cette résolution est faible, ce qui rend la détermination de la structure difficile et imprécise. Par conséquent, la structure n'a pas été déterminée puisque le but de cette expérience était seulement d'observer si les cristaux de notre préparation de TamA diffractaient. Notre objectif est d'obtenir des cristaux de TamA en présence d'un ligand lipidique. La confirmation de ces conditions nous donne un bon point de départ pour optimiser les prochains cristaux.



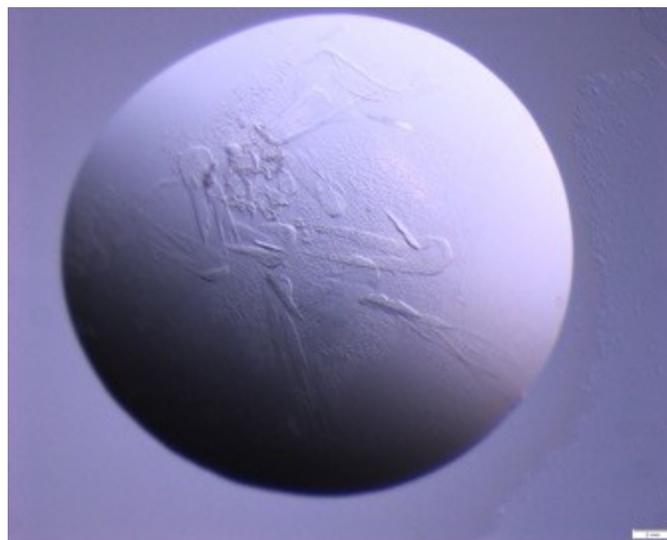
**Figure 4.5 : Crystallisation et diffraction des cristaux natifs de TamA.** (A) Pour obtenir ces cristaux, 1  $\mu$ L de TamA à 15 mg/mL a été mélangé à 1.5  $\mu$ L de solution précipitante composée de 12 % de PEG 4000, 2 % d'isopropanol, 0.05 M  $MgCl_2$  et 0.07 M HEPES pH 7.2 dans une goutte suspendue. Les cristaux ressemblent à des aiguilles et forment des amas. (B) Les cristaux ont diffracté jusqu'à 2.8 Å lorsqu'ils ont été exposés aux rayons X.

#### 4.4 Croissance de TamA en présence de glycérol

L'ajout d'un cryoprotectant à des cristaux développés peut endommager les cristaux par choc osmotique. Ce phénomène se produit lorsque les cristaux sont exposés à un environnement suffisamment différent de celui dans lequel ils ont été cultivés initialement (López-Jaramillo *et al.*, 2002). Les protéines peuvent être cultivées dans des conditions avec des cryoprotectants afin d'éviter les dommages potentiels. Les cristaux de TamA ont été optimisés dans des plaques à

gouttes suspendues où PEG 4000 (8 - 13 %) et glycérol (0 - 15 %) ont été variés. Les cristaux sélectionnés provenaient du puits contenant 9 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.07 M HEPES pH 7.4 et 4 % glycérol dans la goutte avec un rapport de 1 :1.5 TamA/solution du réservoir. Ils sont en forme de larges aiguilles qui sont plus petites que celles cultivées en l'absence de glycérol et ont moins de cristaux par amas (Fig. 4.6). Ces conditions cristallographiques tolèrent jusqu'à 10 % de glycérol, après quoi les cristaux de TamA ne se forment pas.

Ces cristaux n'ont pas été envoyés au synchrotron, car ils sont petits et fusionnés. Les cristaux fusionnés peuvent fournir des données de diffraction imprécises, car lorsque les cristaux de protéines se collent les uns aux autres, cela perturbe le motif ordonné requis pour des mesures précises aux rayons X. Il est donc difficile de déterminer avec précision la forme de la protéine.

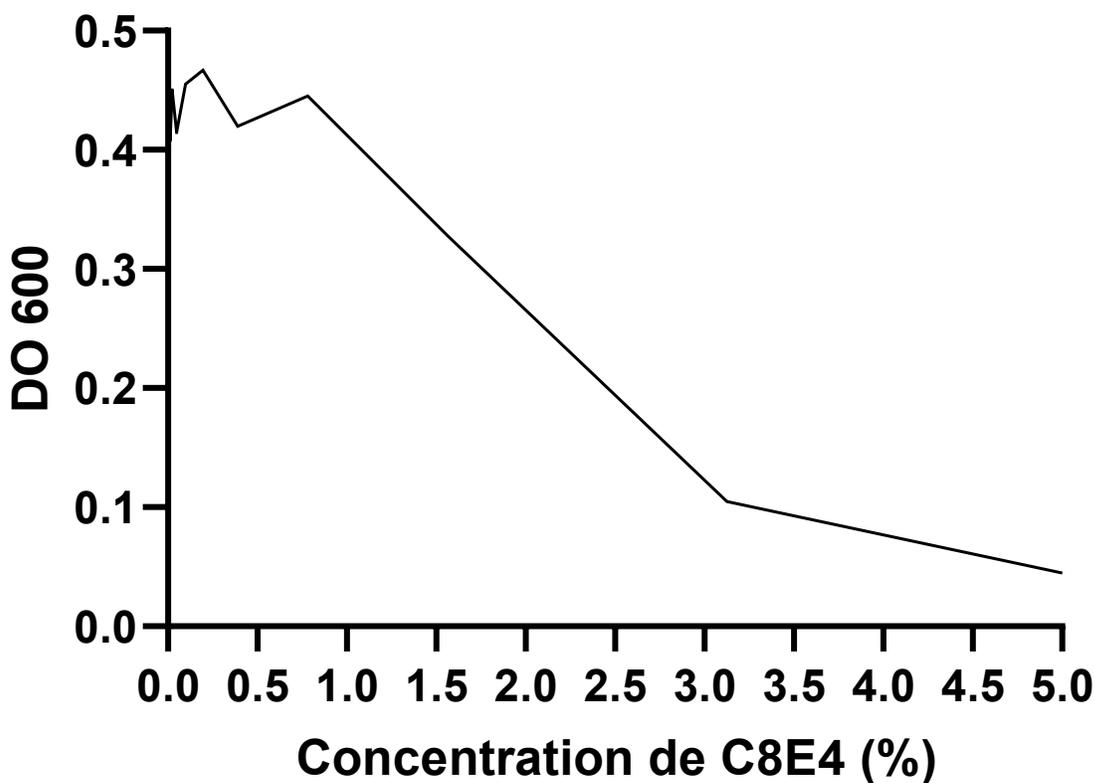


**Figure 4.6 : Cristallisation de TamA avec 4% glycérol.** Pour obtenir ces cristaux, 1  $\mu$ L de TamA à 15 mg/mL a été mélangé à 1.5  $\mu$ L de solution précipitante composée de 9 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.07 M HEPES pH 7.4 et 4 % glycérol. Les cristaux ressemblent à de grandes aiguilles.

#### **4.5 Co-cristallisation de TamA avec PG14 et Lyso PG14**

La co-cristallisation et le trempage des cristaux sont des méthodes possibles pour produire des cristaux avec des substrats. La co-cristallisation a d'abord été tentée en incubant TamA avec des micelles mixtes de détergent C8E4 et de lipides (PG14 ou Lyso PG14) avant de cristalliser le mélange.

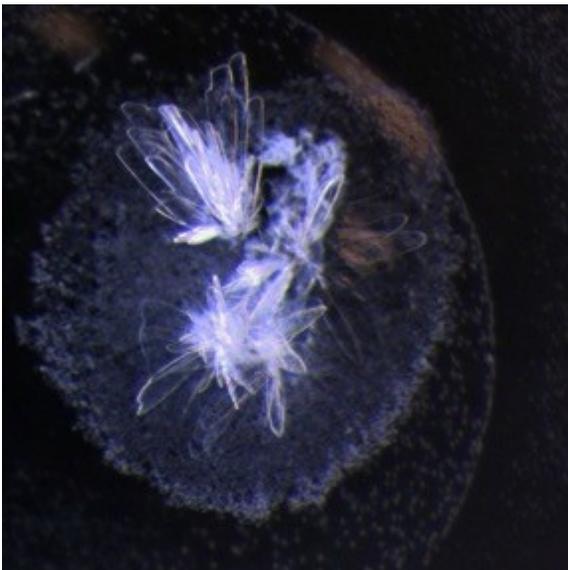
Toutefois, nous avons d'abord cherché à créer des micelles mixtes présentant le rapport lipide/détergent le plus élevé possible afin de maximiser les chances que TamA trouve un lipide et interagisse avec lui. Pour déterminer la quantité minimale de C8E4 nécessaire pour intégrer 10 mM de PG14, C8E4 à 100 % a été dilué en série. Puis, le même volume de chaque dilution est ajouté à des tubes contenant chacun 10 mM de PG14 reconstitué. L'absorbance des échantillons est mesurée par le spectromètre NanoDrop et représentée graphiquement. Nous pouvons observer que l'absorbance commence à diminuer dès que la concentration de C8E4 atteint 1 % et continue à diminuer avant de ralentir lorsque la concentration de 3 % est atteinte (Fig. 4.7). Il faut ainsi au moins 3 % de C8E4 pour intégrer 10 mM de PG14, ce qui équivaut à dix molécules de C8E4 pour une molécule de PG14.



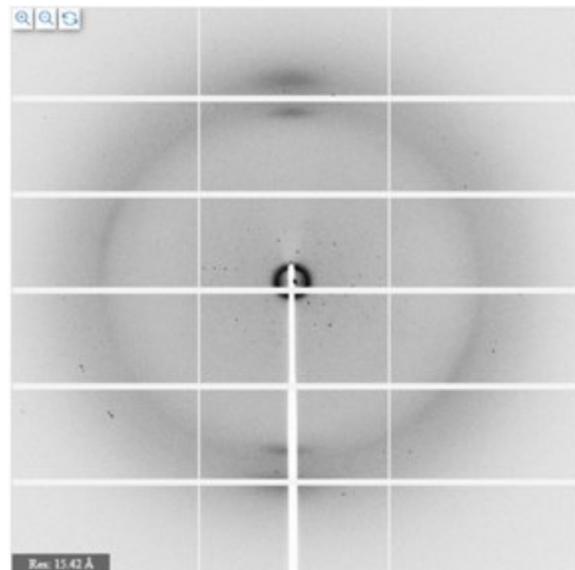
**Figure 4.7 : Absorbance de la solution PG14 en fonction de la quantité de C8E4 ajoutée.** Le C8E4 à 100 % a été dilué en série, puis le même volume de chaque dilution a été ajouté à des tubes contenant chacun 10 mM de PG14 reconstitué. L'absorbance à 600 nm, mesurée par NanoDrop, des échantillons a été tracée en fonction de la concentration de C8E4. La courbe présente une diminution abrupte de l'absorbance, ce qui représente la concentration minimale de C8E4 (3 %) nécessaire pour incorporer 10 mM de PG14 dans des micelles mixtes.

Des micelles mixtes lipides/détergents ont été préparées avec une proportion d'une molécule de PG14 ou de Lyso PG14 pour dix molécules de C8E4. TamA est incubée avec les micelles mixtes de C8E4 avec PG14 avant d'être utilisée dans des plaques de gouttes suspendues à 15 mg/mL. Les cristaux sélectionnés provenaient du puits contenant 10.5 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.05 M MgCl<sub>2</sub> et 0.07 M HEPES pH 7.2 dans la goutte avec un rapport de 1 :1.5 TamA/solution précipitante. Ils sont en forme d'ovale allongé et sont également en amas. Leur structure est similaire à celle des cristaux de TamA native, mais ils sont nettement plus petits. Ces cristaux ont pu être diffractés, mais la résolution était plutôt faible (Fig. 4.8). D'autres lots qui ont diminué la quantité de PG14 de cinq à dix fois ou qui ont remplacé PG14 par Lyso PG14 ont donné des résultats comparables.

A)



B)



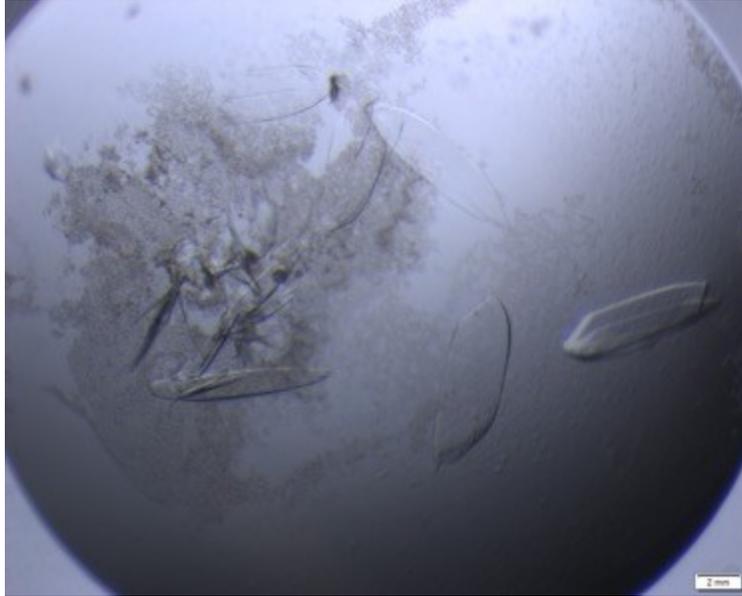
**Figure 4.8 : Cristallisation et diffraction de TamA incubée avec des micelles mixtes de C8E4 et de PG14 (10:1).**

(A) Pour obtenir ces cristaux, 1  $\mu$ L de TamA incubée avec des micelles mixtes de C8E4 et PG14 (10:1) à 15 mg/mL a été mélangée à 1.5  $\mu$ L de solution précipitante composée de 10.5 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.05 M MgCl<sub>2</sub> et 0.07 M HEPES pH 7.2. Les cristaux ressemblent à de grandes aiguilles. Les cristaux ressemblent à des aiguilles et forment des amas. (B) Les cristaux ont diffracté très faiblement lorsqu'ils ont été exposés aux rayons X.

#### **4.6 Optimisation des cristaux de TamA natif pour le trempage de cristaux**

La deuxième méthode disponible pour produire des cristaux avec une protéine interagissant avec un substrat est le trempage des cristaux. Comme pour les cryoprotectants, les cristaux de TamA peuvent se fissurer sous l'effet de la pression osmotique lorsqu'ils sont exposés à un environnement suffisamment différent de celui dans lequel ils ont été cultivés (López-Jaramillo et al., 2002). Ainsi, les cristaux de TamA restants de la vérification des anciennes conditions ont été trempés dans des solutions de PG14 ou de Lyso PG14 et ont ensuite été envoyés au Canadian Light Source pour observer s'ils résistent à ce changement de milieu. Ils ont conservé leur structure suffisamment pour que les données puissent être lues et donc résistent au trempage.

Les cristaux qui ont diffracté suffisamment bien pour résoudre la structure étaient plus grands que ceux que nous avons observé jusqu'à présent. L'objectif était donc de produire des cristaux de TamA natif ayant la plus grande taille possible avant de les tremper. Des plaques d'optimisation ont été réalisées en modifiant la concentration en protéines, les concentrations des précipitants, les rapports protéine-précipitants et le pH. Les cristaux les plus beaux sont apparus dans 9.5 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.065 M  $MgCl_2$  et 0.07 M HEPES pH 7.2 dans des gouttes de 1  $\mu$ L TamA 15 mg/mL mélangées à 1.5  $\mu$ L de solution de réservoir. Les cristaux ont une forme ovale allongée et sont principalement isolés (Fig. 4.9). Cependant, leur résolution est actuellement insuffisante pour résoudre la structure du complexe et d'autres optimisations sont nécessaires.



**Figure 4.9 : Optimisation de la taille des cristaux de TamA natif.** Pour obtenir ces cristaux, 1  $\mu\text{L}$  de TamA à 15 mg/mL a été mélangé à 1.5  $\mu\text{L}$  de solution précipitante composée de 9.5 % PEG 4000, 2.5 % Isopropanol, 0.065 M  $\text{MgCl}_2$  et 0.07 M HEPES pH 7.2. Les cristaux ressemblent à des ovales allongés.

## 5 Discussion

---

Le mécanisme par lequel TamA participe à l'assemblage et à l'insertion des OMPs reste mal compris. Des simulations de dynamique moléculaire suggèrent que deux arginines dans la porte latérale de TamA sont des sites de liaison conservés aux phospholipides. Les têtes polaires des lipides interagiraient avec les chaînes latérales arginine, ce qui peut empêcher les lipides d'entrer dans le tonneau de TamA et les arginines serviraient donc de gardiennes pour le tonneau. Cette interaction pourrait également aider TamB à transporter les phospholipides entre les membranes interne et externe. Les principaux objectifs de cette étude étaient d'évaluer l'importance des arginines conservées pour l'activité insertase de TamA et de valider les arginines en tant que sites de liaison aux phospholipides, comme prédit par les simulations.

Le système TAM est une découverte relativement récente et a reçu moins d'attention que le système BAM, qui est largement répandu dans les bactéries à Gram négatif. Par conséquent, notre compréhension du système TAM reste limitée et le modèle fonctionnel de sa sous-unité TamA est principalement dérivé des connaissances acquises sur son homologue BamA. La superposition des structures de BamA et de TamA révèle des similitudes considérables entre ces deux protéines de la famille Omp85 (Fig. 1.7) (Bamert *et al.*, 2017). Elles possèdent toutes deux des tonneaux  $\beta$  composés de 16 brins  $\beta$  antiparallèles, le premier et dernier brin s'associant pour fermer le tonneau. Cependant, cette association est faible, ce qui permet l'ouverture d'une porte latérale par séparation de ces brins (Gruss *et al.*, 2013; Noinaj *et al.*, 2014). De plus, l'analyse structurale des deux protéines a défini une section entre le premier et le dernier brin du tonneau  $\beta$  comme étant le site de liaison et de repliement du substrat, et cette région de TamA présente une conservation structurale avec celle de BamA (Selkrig *et al.*, 2015). En outre, des études évolutives suggèrent que TamA aurait évolué à partir d'un duplicata du gène de BamA (Heinz *et al.*, 2015). Ces données ont conduit à la suggestion que BamA et TamA pourraient utiliser un mécanisme similaire pour leur activité. Compte tenu de leurs ressemblances structurelles, ce serait la structure de ces protéines qui conférerait leur activité d'insertase.

Il a été démontré que BamA seule était capable de catalyser le repliement des OMPs *in vitro* dans des liposomes composés de 80 % de PC10 + 20 % de PE DiC10 (Plummer *et al.*, 2015). Il a donc été supposé que l'intégration de TamA dans les liposomes catalyserait également le repliement des OMPs *in vitro*. Cependant, les résultats de nos expériences d'activité insertase indiquent que l'incorporation de TamA dans des liposomes de différentes compositions lipidiques n'a eu aucun

effet sur le taux de repliement du substrat OmpX. Ceci est contraire à l'hypothèse et impliquerait que l'activité observée chez BamA est spécifique à BamA et non à la structure de la protéine.

L'absence d'effet pourrait être attribuable au fait que OmpX n'est pas un substrat de TamA ou que TamA a besoin de sa protéine partenaire TamB pour fonctionner. En effet, tandis que BamA a une activité insertase générale, il a été démontré que TamA a une gamme spécifique de substrats, qui n'ont pas tous été identifiés (Heinz *et al.*, 2015). Cette gamme spécifique de substrats s'expliquerait par trois éléments clés qui diffèrent entre BamA et TamA en dépit de leurs similitudes structurelles globales. La taille du tonneau, la distribution des résidus chargés dans le tonneau et la position relative du premier et du dernier brin  $\beta$  sont tous différents. En effet, le domaine transmembranaire de TamA est plus perpendiculaire à la membrane que celui de BamA. Cela se traduit par des brins  $\beta$  plus courts et des boucles plus courtes entre les brins, d'où un tonneau plus petit. Une analyse de l'environnement électrique des deux tonneaux a par ailleurs montré que le tonneau de TamA contient beaucoup plus de résidus chargés que celui de BamA. Pris ensemble, le tonneau plus petit et plus chargé de TamA influencerait la dynamique de sa porte latérale et donc la gamme de substrats protéiques qu'elle catalyserait (Bamert *et al.*, 2017).

Afin de valider la méthodologie du test d'activité de l'insertase utilisé et de déterminer si l'absence d'effet observée avec TamA peut être attribuée au fait qu'OmpX n'est pas un substrat de TamA, nous avons inclus BamA en tant que contrôle positif. BamA contribue à l'assemblage et à l'insertion de la plupart des OMPs (Webb *et al.*, 2012). Le gène de BamA a été cloné avec succès à partir d'*E. coli* par clonage RF, puis transformé dans plusieurs cellules compétentes afin de déterminer les cellules compétentes optimales pour la production de BamA. Ces cellules ont été cultivées, récoltées et lysées puis les lysats ont été filtrés. Les lysats totaux et solubles ont ensuite été analysés par Western blot. La seule bande qui est apparue était dans le lysat total de C43, qui était aussi la cellule compétente utilisée pour exprimer TamA dans cette étude. Cependant, la bande n'est pas bien définie et son poids est beaucoup plus faible que celui de BamA, ce qui rend très improbable que la bande de protéine corresponde à BamA. Cette bande est vraisemblablement le résultat d'une erreur lors de la transformation ou de la surexpression.

La flexibilité des protéines membranaires pose des problèmes pour leur expression, leur solubilisation et leur purification (Carpenter *et al.*, 2008). Ainsi, pour améliorer l'expression de BamA, nous pourrions éliminer un ou plusieurs de ses domaines POTRA très flexibles, car le test de l'activité insertase nécessite surtout le tonneau de BamA. La délétion de ces domaines peut être réalisée en incorporant une séquence reconnue par une enzyme de restriction aux deux extrémités du domaine POTRA dans le plasmide. Il faudra assurer que la séquence n'est pas

déjà présente dans le plasmide. Le plasmide peut alors être clivé à l'aide de l'enzyme de restriction correspondante et les extrémités peuvent être ligaturées à l'aide d'une ADN ligase pour obtenir une séquence sans le domaine POTRA. Ou alors, les gènes peuvent être commandés d'une compagnie spécialisée déjà sous-clonés dans un vecteur prêt à la surexpression chez *E. coli*.

Une approche supplémentaire pour vérifier si l'absence d'effet observé lors de l'intégration de TamA dans le liposome est attribuable au fait que OmpX n'est pas un substrat de TamA consiste à remplacer OmpX dans l'essai d'activité insertase par une protéine qui a été précédemment identifiée comme un substrat de TamA, telle que la protéine "usher" FimD (Stubenrauch *et al.*, 2016) ou l'adhésine d'autotransporteur Ag43 (Selkrig *et al.*, 2012).

L'absence d'effet de TamA sur le taux de repliement d'OmpX pourrait également être due au fait que TamA seule n'est pas suffisante pour catalyser la biogenèse des OMPs *in vitro* et qu'elle nécessite sa protéine partenaire TamB. TamB est ancrée à la membrane interne et traverse le périplasme pour entrer en contact avec les domaines POTRA de TamA et s'y lier (Selkrig *et al.*, 2012). Des études utilisant le QCM-D et le MCRN ont montré que les domaines POTRA s'étendent dans l'espace périplasmique lors de la liaison du substrat. Ces données ont conduit à la proposition d'un mécanisme selon lequel, lors de la liaison du substrat, les domaines POTRA de TamA poussent contre TamB mais ne peuvent pas surmonter la pression de turgescence et la couche de peptidoglycane qui rigidifie TamB. Cela provoque la remontée de TamA et la déformation de la membrane externe à proximité de TamA, ce qui facilite l'insertion des OMPs dans la membrane (Selkrig *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2014; Stubenrauch *et al.*, 2019). Il est donc possible que TamA seule ne puisse pas catalyser le repliement des OMP, car ses domaines POTRA n'auraient rien contre lequel pousser et la membrane ne serait pas déstabilisée. En outre, le complexe Tam perd sa fonction lorsque TamA ou TamB est supprimé (Selkrig *et al.*, 2012), ce qui renforce l'idée que TamA a besoin de sa protéine partenaire pour son activité d'insertase.

Il a été démontré que TamB et ses paralogues YhdP et YdbH jouent des rôles redondants mais non équivalents dans le transport des phospholipides et l'homéostasie lipidique de la membrane externe. Ces protéines fonctionnent comme des ponts reliant les membranes interne et externe, facilitant ainsi le transport des phospholipides entre elles. Pour accomplir cette fonction, TamB a besoin de sa protéine partenaire TamA (Ruiz *et al.*, 2021). Or, des études ont démontré que certaines caractéristiques de la membrane, notamment la tête polaire et la longueur de la chaîne acyle des lipides qui composent la membrane, la phase lipidique de la membrane et sa courbure, peuvent influencer considérablement le repliement des protéines (Horne *et al.*, 2020). Il est donc

concevable que TamA contribuerait au repliement des protéines substrats en maintenant la membrane dans un état favorable plutôt qu'en catalysant directement le repliement, et sans TamB, TamA n'est pas en mesure de le faire.

Les versions mutantes de TamA, TamA R286A\_R288A et TamA R286D\_R288D ont pu être obtenues par clonage RF. Cependant, l'incorporation de TamA dans les liposomes n'a pas eu d'effet sur le taux de repliement d'OmpX, de sorte que nous n'avons pas de point de comparaison pour le repliement catalysé. Les mutants ne sont donc pas utilisés dans cette expérience. Ils peuvent être conservés pour des expériences ultérieures, telles que la cristallisation de la protéine avec un ligand, comme décrit dans la section suivante. Si nous parvenons à obtenir de tels cristaux de TamA avec un ligand lipidique, les mutants pourraient être utilisés pour voir si la substitution des arginines affecte la liaison aux lipides.

En effet, la deuxième partie de cette étude consistait à cristalliser TamA avec un ligand lipidique afin de valider les arginines en tant que sites de liaison aux phospholipides tels que prédits par les simulations de dynamique moléculaire. La première étape pour produire des cristaux est le criblage, qui consiste à combiner notre protéine d'intérêt avec divers conditions afin de déterminer si l'une d'entre elles conduit à la formation d'un cristal (McPherson *et al.*, 2014). Cela nécessite beaucoup d'essais et d'erreurs car la concentration de la protéine, le type et la concentration du précipitant, le type de tampon, le pH, la température et la technique de cristallisation utilisée sont toutes des variables qui peuvent affecter la capacité de la protéine à cristalliser (Chayen *et al.*, 2008).

Les conditions de cristallisation de la TamA en l'absence de ligands sont déjà connues. Nous avons donc cherché à confirmer que notre préparation de TamA produirait des cristaux qui diffractent dans les mêmes conditions. Pour ce faire, des plaques d'optimisation ont été préparées en utilisant les conditions mentionnées. Un résultat positif permettrait d'éviter l'étape de criblage qui prend beaucoup de temps et qui implique généralement de nombreux essais et erreurs. Nous avons obtenu des cristaux en forme d'aiguille qui se regroupent en amas. Malheureusement, la récolte d'un de ces cristaux nécessite souvent de casser ses voisins, ce qui réduit le nombre de cristaux disponibles pour l'étude. Les cristaux ont diffracté jusqu'à 2.8 Å, confirmant la production de cristaux diffractant avec les conditions connues. Cependant, la résolution est faible, ce qui signifie qu'il serait difficile et imprécis de déterminer la structure.

Les cristaux matures sont rapidement congelés dans de l'azote liquide après leur récolte afin de préserver leur qualité durant le transport et la collecte des données de diffraction. Toutefois, ce traitement peut entraîner la formation de cristaux de glace, qui peuvent endommager les cristaux

et perturber les mesures au synchrotron pendant la collecte des données de diffraction. Pour remédier à ce problème, un cryoprotectant est ajouté soit directement à la goutte dans la plaque d'optimisation, soit par trempage des cristaux après la récolte. Les cryoprotectants abaissent le point de congélation de l'eau, empêchant ainsi la formation de glace (Pflugrath, 2015). Or, lorsque les cristaux sont exposés à un environnement suffisamment différent de celui dans lequel ils ont grandi, ils peuvent subir un choc osmotique et se fissurer (López-Jaramillo *et al.*, 2002). Des cristaux de TamA de type sauvage, auxquels des cryoprotectants ont été ajoutés, ont été envoyés au synchrotron pour observer l'impact potentiel des cryoprotectants sur les cristaux. Ils ont très bien résisté à l'ajout de cryoprotectants.

Cependant, il serait préférable que les cristaux soient cultivés en présence d'un ou plusieurs cryoprotectants afin d'éviter le risque de fissuration des cristaux dû au choc osmotique provoqué par l'ajout de cryoprotectant. Nous avons observé que la formation de cristaux de TamA peut résister à une concentration de glycérol allant jusqu'à 10 %, mais au-delà de cette concentration, la croissance des cristaux est entravée. Les cristaux formés en présence de glycérol sont plus petits que ceux cultivés sans glycérol, ce qui complique la collecte des données de diffraction. L'augmentation de la viscosité résultant de l'ajout de glycérol ralentirait la nucléation et la croissance des cristaux (Sleutel *et al.*, 2012). Cependant, comme les cristaux sont assez résistants à l'ajout de cryoprotectant, il n'est pas avantageux de sacrifier des cristaux plus gros pour les cultiver dans du glycérol.

L'approche initiale pour cristalliser TamA en présence d'un ligand lipidique a été la co-cristallisation. Des micelles mixtes, composées de C8E4 et d'une quantité saturante de lipides (PG14 ou Lyso PG14), ont été préparées et incubées avec TamA pendant l'étape de purification. Le mélange résultant a été utilisé pour produire des plaques d'optimisation, en utilisant les conditions établies pour la cristallisation de TamA sans ligand. Les deux variétés de micelles mixtes ont produit des amas de cristaux en forme d'aiguille. Lorsque ces cristaux ont été envoyés au synchrotron, il a été constaté qu'ils diffractaient très faiblement. La résolution de la structure serait donc extrêmement difficile et l'identification de la position d'un ligand serait encore plus ardue.

L'interaction entre les protéines membranaires et les lipides de la membrane est souvent essentielle pour le bon fonctionnement et l'intégrité structurelle de la protéine. Il est donc extrêmement important de fournir un environnement lipidique approprié pour la purification et la cristallisation des protéines membranaires (Hunte *et al.*, 2008). Par conséquent, les cristaux plus petits et leur faible résolution seraient dus à l'ajout des lipides (PG14 ou Lyso PG14), qui

perturberaient l'environnement lipidique favorable à la cristallisation de TamA. Nous avons tenté d'atténuer l'impact des lipides en réduisant leur quantité dans les micelles mixtes par un facteur allant jusqu'à dix, mais nous avons obtenu des résultats comparables. Il semblerait donc que les conditions de cristallisation établies pour TamA en l'absence de ligands soient très sensibles à l'ajout d'autres composés. L'ajout d'un cryoprotectant comme le glycérol ou d'un lipide (PG14 ou Lyso PG14) a des effets inhibiteurs sur la croissance des cristaux. Par conséquent, il semble improbable que l'optimisation des plaques de co-cristallisation de TamA, en utilisant les conditions établies pour TamA en l'absence de ligands, produise des cristaux avec une résolution adéquate pour la détermination structurale.

La deuxième approche pour cristalliser TamA avec un ligand lipidique a été d'effectuer le trempage des cristaux. Dans cette approche, un cristal de protéine cultivé en l'absence de ligand est trempé dans une solution contenant le ligand étudié. Comme dans le cas de l'ajout de cryoprotectant, les cristaux peuvent être endommagés par un choc osmotique suite à un trempage dans un environnement suffisamment différent de celui dans lequel ils ont été cultivés (López-Jaramillo *et al.*, 2002). Nous avons donc trempé des cristaux de TamA restants après la validation des conditions établies dans des solutions précipitantes contenant soit du PG14, soit du Lyso PG14, et nous les avons envoyés au synchrotron. Nous avons observé qu'ils conservaient bien leur forme dans la nouvelle solution.

Des données antérieures de notre laboratoire indiquent que les cristaux de TamA capables de diffracter à une résolution suffisante pour résoudre la structure étaient plus grands que ceux obtenus dans cette étude. Nous avons donc cherché à optimiser la taille des cristaux avant de procéder au trempage. Nous avons préparé plusieurs plaques d'optimisation, en variant la concentration de TamA, les concentrations des précipitants, le pH du tampon et le rapport entre les solutions de protéines et de précipitants. Les meilleurs cristaux ont été obtenus dans le puits contenant 9.5 % de PEG 4000, 2.5 % d'isopropanol, 0.065 MgCl<sub>2</sub> et 0.07 M HEPES pH 7.2 avec des gouttes contenant 1 µL de TamA à 15 mg/mL mélangé à 1.5 µL de solution précipitante. Ces cristaux étaient principalement de forme ovale allongée et présentaient une taille supérieure à celle obtenue dans les conditions connues, tout en restant pour la plupart isolés, nécessitant ainsi une perturbation minimale de leurs voisins pour leur récolte.

Cependant, des améliorations sont encore nécessaires car les cristaux ne diffractent toujours pas à une résolution suffisante pour déterminer leur structure. Une stratégie potentielle consiste à restreindre ou à contourner la phase de nucléation afin que les noyaux qui apparaissent bénéficient de plus d'espace et de ressources pour se développer. Deux techniques possibles

sont l'ensemencement des cristaux et la modification des conditions de cristallisation après la formation des noyaux initiaux. L'ensemencement de cristaux consiste à pulvériser un cristal développé de la même protéine ou d'une protéine apparentée, puis à l'utiliser pour inoculer des gouttes de cristallisation fraîches. Cela peut servir de base à la croissance des cristaux, ce qui permet d'éviter la phase de nucléation. La deuxième technique possible consiste à transférer les gouttes dans de nouveaux puits avec une concentration plus ou moins élevée de précipitants après la formation des premiers noyaux (Chayen *et al.*, 2008).

## 6 Conclusion

---

Ce travail visait à valider deux arginines dans la porte latérale de TamA en tant que des sites d'interaction conservés avec les phospholipides, comme prédit par les simulations de dynamique moléculaire, et à identifier leur contribution à l'activité insertase de TamA. Nous n'avons pas pu déterminer si les arginines interagissent avec les lipides ou si elles contribuent à faciliter l'insertion des protéines substrats dans la membrane.

Des expériences mesurant l'activité insertase dans des liposomes ont montré que l'insertion de TamA dans des bicouches lipidiques de différentes compositions n'a pas amélioré le taux de repliement d'OmpX, contrairement à l'hypothèse selon laquelle BamA et TamA fonctionnent de manière similaire en raison de leur similarité structurelle et de leur relation évolutive. L'absence d'effets observables de TamA signifie que nous n'avons pas de base de référence à laquelle nous pourrions comparer les taux de repliement des TamA mutants, de sorte que le rôle des arginines ne peut pas être déterminé. Cela s'expliquerait par le fait que l'OmpX n'est pas un substrat de TamA ou que TamA a besoin de sa protéine partenaire TamB pour fonctionner. L'utilisation de BamA comme contrôle positif permettrait d'éclaircir ce point, puisqu'il a été démontré que BamA seul catalyse les OMPs, y compris OmpX.

Des cristaux de TamA natif ont pu être cultivés et ils diffractent jusqu'à 2.8 Å, une faible résolution qui rend la détermination de la structure difficile. Par ailleurs, la co-cristallisation de TamA avec des micelles mixtes de C8E4 avec PG14 ou Lyso PG14 a produit des cristaux plus petits que les cristaux de TamA seul. Ces cristaux ont aussi diffracté mais à une très faible résolution. Ces résultats suggèrent que les lipides entravent la nucléation et la croissance des cristaux. Ainsi, jusqu'à présent, aucun cristal de TamA avec un substrat lipidique, produit par co-cristallisation, a diffracté à une résolution suffisamment basse pour résoudre une structure.

Ensuite, la taille de la TamA a été optimisée avant d'effectuer le trempage des cristaux, car les anciens cristaux qui ont diffracté à une résolution suffisante pour résoudre sa structure étaient plus grands que ceux obtenus dans cette étude. En faisant varier la concentration des précipitants et des protéines ainsi que le rapport protéine/réservoir dans la goutte, des cristaux plus grands et plus isolés ont été obtenus. La taille pourrait être encore améliorée en limitant ou en éliminant l'étape de nucléation des cristaux. L'étape suivante consisterait à prendre les grands cristaux cultivés et à les exposer à une solution contenant des lipides. Si la méthode de trempage des cristaux échoue également, la cristallisation devrait être reprise à zéro avec un criblage de TamA

incubés avec PG14 ou Lyso PG14 contre les conditions les plus propices pour l'obtention de cristaux des protéines.

## 7 Références

---

- Adedeji WA (2016) THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Ann Ib Postgrad Med* 14(2):56-57.
- Albenne C, Ieva R (2017) Job contenders: roles of the  $\beta$ -barrel assembly machinery and the translocation and assembly module in autotransporter secretion. *Molecular Microbiology* 106(4):505-517.
- Albrecht R, Schütz M, Oberhettinger P, Faulstich M, Bermejo I, Rudel T, Diederichs K, Zeth K (2014) Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70(Pt 6):1779-1789.
- Bamert RS, Lundquist K, Hwang H, Webb CT, Shiota T, Stubenrauch CJ, Belousoff MJ, Goode RJA, Schittenhelm RB, Zimmerman R, Jung M, Gumbart JC, Lithgow T (2017) Structural basis for substrate selection by the translocation and assembly module of the  $\beta$ -barrel assembly machinery. *Mol Microbiol* 106(1):142-156.
- Benamara H, Rihouey C, Abbes I, Ben Mlouka MA, Hardouin J, Jouenne T, Alexandre S (2014) Characterization of membrane lipidome changes in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm growth on glass wool. *PLoS One* 9(9):e108478.
- Botelho J, Grosso F, Peixe L (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat* 44:100640.
- Bryksin AV, Matsumura I (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* 48(6):463-465.
- Burall LS, Harro JM, Li X, Lockett CV, Himpsl SD, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HL (2004) *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun* 72(5):2922-2938.
- Burgess NK, Dao TP, Stanley AM, Fleming KG (2008) Beta-barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in vitro. *J Biol Chem* 283(39):26748-26758.
- Butler MS, Henderson IR, Capon RJ, Blaskovich MAT (2023) Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. *J Antibiot (Tokyo)* 76(8):431-473.
- Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S (2008) Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 18(5):581-586.
- Chao J, Wolfaardt GM, Arts MT (2010) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Can J Microbiol* 56(12):1028-1039.
- Chayen NE, Saridakis E (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* 5(2):147-153.
- Doerner PA, Sousa MC (2017) Extreme Dynamics in the BamA  $\beta$ -Barrel Seam. *Biochemistry* 56(24):3142-3149.
- Doyle MT, Bernstein HD (2022a) Function of the Omp85 Superfamily of Outer Membrane Protein Assembly Factors and Polypeptide Transporters. *Annual Review of Microbiology* 76(1):259-279.

- Doyle MT, Jimah JR, Dowdy T, Ohlemacher SI, Larion M, Hinshaw JE, Bernstein HD (2022b) Cryo-EM structures reveal multiple stages of bacterial outer membrane protein folding. *Cell* 185(7):1143-1156.e1113.
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37(1):203-206.
- Gessmann D, Chung YH, Danoff EJ, Plummer AM, Sandlin CW, Zaccai NR, Fleming KG (2014) Outer membrane  $\beta$ -barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(16):5878-5883.
- Gruss F, Zähringer F, Jakob RP, Burmann BM, Hiller S, Maier T (2013) The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(11):1318-1320.
- Gu Y, Li H, Dong H, Zeng Y, Zhang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, Wang Z, Zhang Y, Wang W, Dong C (2016) Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. *Nature* 531(7592):64-69.
- Heinz E, Selkrig J, Belousoff MJ, Lithgow T (2015) Evolution of the Translocation and Assembly Module (TAM). *Genome Biol Evol* 7(6):1628-1643.
- Höhr AIC, Lindau C, Wirth C, Qiu J, Stroud DA, Kutik S, Guiard B, Hunte C, Becker T, Pfanner N, Wiedemann N (2018) Membrane protein insertion through a mitochondrial  $\beta$ -barrel gate. *Science* 359(6373).
- Horne JE, Brockwell DJ, Radford SE (2020) Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 295(30):10340-10367.
- Hunte C, Richers S (2008) Lipids and membrane protein structures. *Curr Opin Struct Biol* 18(4):406-411.
- Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51:72-80.
- Jiang N, Ding X, Lu Y (2021) Development of a robust *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis application platform. *Biochem Eng J* 165:107830.
- Josts I, Stubenrauch CJ, Vadlamani G, Mosbahi K, Walker D, Lithgow T, Grinter R (2017) The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic  $\beta$  Taco Fold. *Structure* 25(12):1898-1906.e1895.
- Jung HJ, Sorbara MT, Pamer EG (2021) TAM mediates adaptation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to antimicrobial stress during host colonization and infection. *PLoS Pathog* 17(2):e1009309.
- Kapoor G, Saigal S, Elongavan A (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 33(3):300-305.
- Kim S, Jeong H, Kim EY, Kim JF, Lee SY, Yoon SH (2017) Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Nucleic Acids Res* 45(9):5285-5293.
- Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D (2007) Structure and Function of an Essential Component of the Outer Membrane Protein Assembly Machine. *Science* 317(5840):961-964.
- Lambert PA (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95 Suppl 41(Suppl 41):22-26.

- Lewis K (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology* 5(1):48-56.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009) Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* 22(4):582-610.
- López-Jaramillo FJ, Moraleta AB, González-Ramírez LA, Carazo A, García-Ruiz JM (2002) Soaking: the effect of osmotic shock on tetragonal lysozyme crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 2):209-214.
- López D, Vlamakis H, Kolter R (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(7):a000398.
- Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, Misra R, Silhavy TJ (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 61(1):151-164.
- McPherson A, Gavira JA (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70(Pt 1):2-20.
- Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260(3):289-298.
- Morgado L, Zeth K, Burmann BM, Maier T, Hiller S (2015) Characterization of the insertase BamA in three different membrane mimetics by solution NMR spectroscopy. *J Biomol NMR* 61(3-4):333-345.
- Murray CJLea, (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399(10325):629-655.
- Noinaj N, Fairman JW, Buchanan SK (2011) The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. *J Mol Biol* 407(2):248-260.
- Noinaj N, Gumbart JC, Buchanan SK (2017) The  $\beta$ -barrel assembly machinery in motion. *Nat Rev Microbiol* 15(4):197-204.
- Noinaj N, Kuszak AJ, Balusek C, Gumbart JC, Buchanan SK (2014) Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. *Structure* 22(7):1055-1062.
- Noinaj N, Kuszak AJ, Gumbart JC, Lukacik P, Chang H, Easley NC, Lithgow T, Buchanan SK (2013) Structural insight into the biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature* 501(7467):385-390.
- Noinaj N, Rollauer SE, Buchanan SK (2015) The  $\beta$ -barrel membrane protein insertase machinery from Gram-negative bacteria. *Curr Opin Struct Biol* 31:35-42.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 37(1):177-192.
- Peleg Y, Unger T (2014) Application of the Restriction-Free (RF) cloning for multicomponents assembly. *Methods Mol Biol* 1116:73-87.
- Pflugrath JW (2015) Practical macromolecular cryocrystallography. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 71(Pt 6):622-642.
- Pichlo C, Montada AA, Schacherl M, Baumann U (2016) Production, Crystallization and Structure Determination of *C. difficile* PPEP-1 via Microseeding and Zinc-SAD. *J Vis Exp* 10.3791/55022(118).

- Plummer AM, Fleming KG (2015) BamA Alone Accelerates Outer Membrane Protein Folding In Vitro through a Catalytic Mechanism. *Biochemistry* 54(39):6009-6011.
- Prasad NK, Seiple IB, Cirz RT, Rosenberg OS (2022) Leaks in the Pipeline: a Failure Analysis of Gram-Negative Antibiotic Development from 2010 to 2020. *Antimicrob Agents Chemother* 66(5):e0005422.
- Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, Liang H, Song X, Wu M (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):199.
- Ranava D, Caumont-Sarcos A, Albenne C, Ieva R (2018) Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded  $\beta$ -barrel proteins. *FEMS Microbiology Letters* 365(10).
- Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183(23):6794-6800.
- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* 4(11):e377.
- Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N, Buchanan SK (2015) Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1679).
- Rouvière PE, Gross CA (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 10(24):3170-3182.
- Ruiz N, Davis RM, Kumar S (2021) YhdP, TamB, and YdbH Are Redundant but Essential for Growth and Lipid Homeostasis of the Gram-Negative Outer Membrane. *mBio* 12(6):e0271421.
- Sandoval CM, Baker SL, Jansen K, Metzner SI, Sousa MC (2011) Crystal structure of BamD: an essential component of the  $\beta$ -Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. *J Mol Biol* 409(3):348-357.
- Selkrig J, Belousoff MJ, Headey SJ, Heinz E, Shiota T, Shen H-H, Beckham SA, Bamert RS, Phan M-D, Schembri MA, Wilce MCJ, Scanlon MJ, Strugnell RA, Lithgow T (2015) Conserved features in TamA enable interaction with TamB to drive the activity of the translocation and assembly module. *Scientific Reports* 5(1):12905.
- Selkrig J, Mosbahi K, Webb CT, Belousoff MJ, Perry AJ, Wells TJ, Morris F, Leyton DL, Totsika M, Phan MD, Celik N, Kelly M, Oates C, Hartland EL, Robins-Browne RM, Ramarathinam SH, Purcell AW, Schembri MA, Strugnell RA, Henderson IR, Walker D, Lithgow T (2012) Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes. *Nat Struct Mol Biol* 19(5):506-510, s501.
- Shen C, Chang S, Luo Q, Chan KC, Zhang Z, Luo B, Xie T, Lu G, Zhu X, Wei X, Dong C, Zhou R, Zhang X, Tang X, Dong H (2023) Structural basis of BAM-mediated outer membrane  $\beta$ -barrel protein assembly. *Nature* 617(7959):185-193.
- Shen H-H, Leyton DL, Shiota T, Belousoff MJ, Noinaj N, Lu J, Holt SA, Tan K, Selkrig J, Webb CT, Buchanan SK, Martin LL, Lithgow T (2014) Reconstitution of a nanomachine driving the assembly of proteins into bacterial outer membranes. *Nature Communications* 5(1):5078.
- Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ (2007a) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15):6400-6405.

- Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ (2007b) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 21(19):2473-2484.
- Sleutel M, Van Driessche AE, Pan W, Reichel EK, Maes D, Vekilov PG (2012) Does Solution Viscosity Scale the Rate of Aggregation of Folded Proteins? *J Phys Chem Lett* 3(10):1258-1263.
- Smyth MS, Martin JH (2000) x ray crystallography. *Mol Pathol* 53(1):8-14.
- Spiess C, Beil A, Ehrmann M (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97(3):339-347.
- Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292(2):107-113.
- Stubenrauch C, Belousoff MJ, Hay ID, Shen H-H, Lillington J, Tuck KL, Peters KM, Phan M-D, Lo AW, Schembri MA, Strugnell RA, Waksman G, Lithgow T (2016) Effective assembly of fimbriae in *Escherichia coli* depends on the translocation assembly module nanomachine. *Nature Microbiology* 1(7):16064.
- Stubenrauch CJ, Lithgow T (2019) The TAM: A Translocation and Assembly Module of the  $\beta$ -Barrel Assembly Machinery in Bacterial Outer Membranes. *EcoSal Plus* 8(2):10.1128/ecosalplus.ESP-0036-2018.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18(3):318-327.
- Tomasek D, Rawson S, Lee J, Wzorek JS, Harrison SC, Li Z, Kahne D (2020) Structure of a nascent membrane protein as it folds on the BAM complex. *Nature* 583(7816):473-478.
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* 172(1):34-44.
- van den Ent F, Löwe J (2006) RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods* 67(1):67-74.
- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299(5604):262-265.
- Warner LR, Varga K, Lange OF, Baker SL, Baker D, Sousa MC, Pardi A (2011) Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set. *J Mol Biol* 411(1):83-95.
- Webb CT, Heinz E, Lithgow T (2012) Evolution of the  $\beta$ -barrel assembly machinery. *Trends Microbiol* 20(12):612-620.
- Weirich J, Bräutigam C, Mühlenkamp M, Franz-Wachtel M, Macek B, Meuskens I, Skurnik M, Leskinen K, Bohn E, Autenrieth I, Schütz M (2017) Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for anti-infective drugs. *Virulence* 8(7):1170-1188.
- Wienen-Schmidt B, Oebbeke M, Ngo K, Heine A, Klebe G (2021) Two Methods, One Goal: Structural Differences between Cocrystallization and Crystal Soaking to Discover Ligand Binding Poses. *ChemMedChem* 16(1):292-300.

- Wu R, Stephenson R, Gichaba A, Noinaj N (2020) The big BAM theory: An open and closed case? *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862(1):183062.
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* 121(2):235-245.
- Xu Q, Guo M, Yu F (2023)  $\beta$ -Barrel Assembly Machinery (BAM) Complex as Novel Antibacterial Drug Target. *Molecules* 28(9).

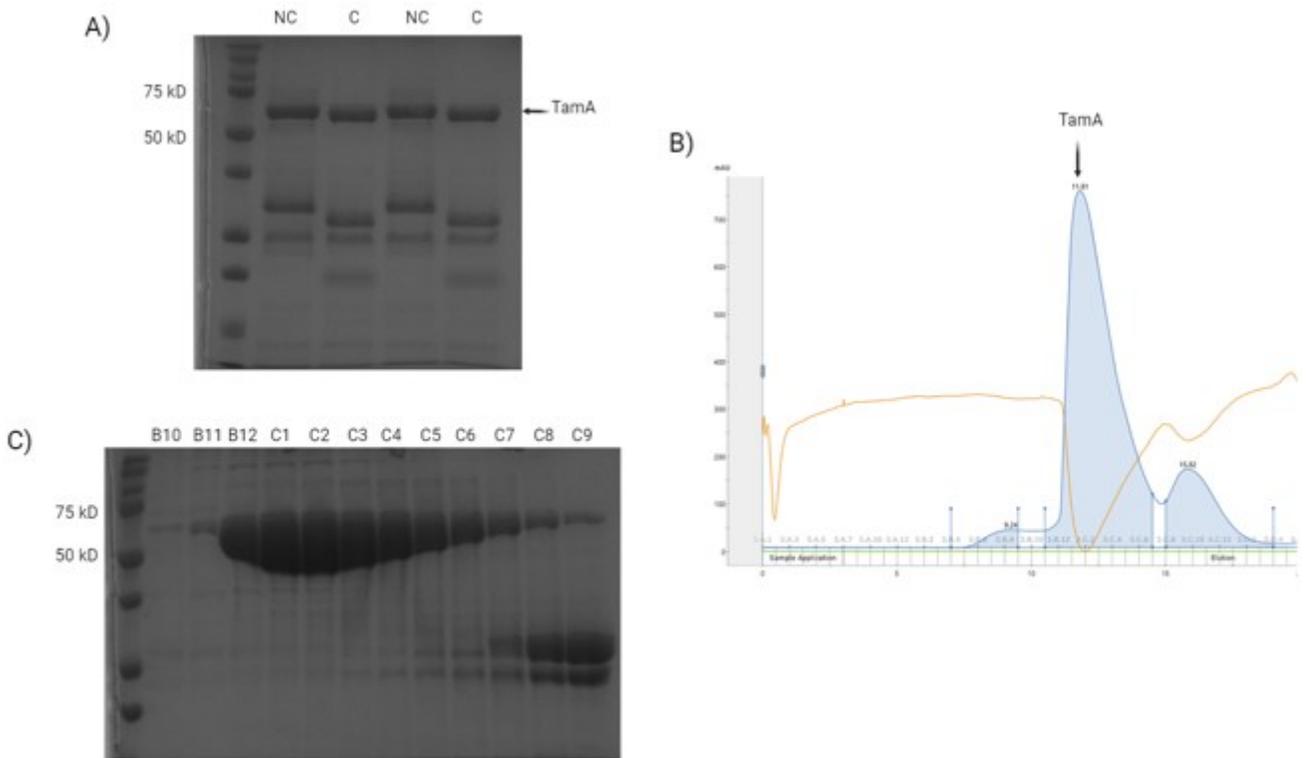
## 8 Annexe

---

### 8.1 Purification de TamA

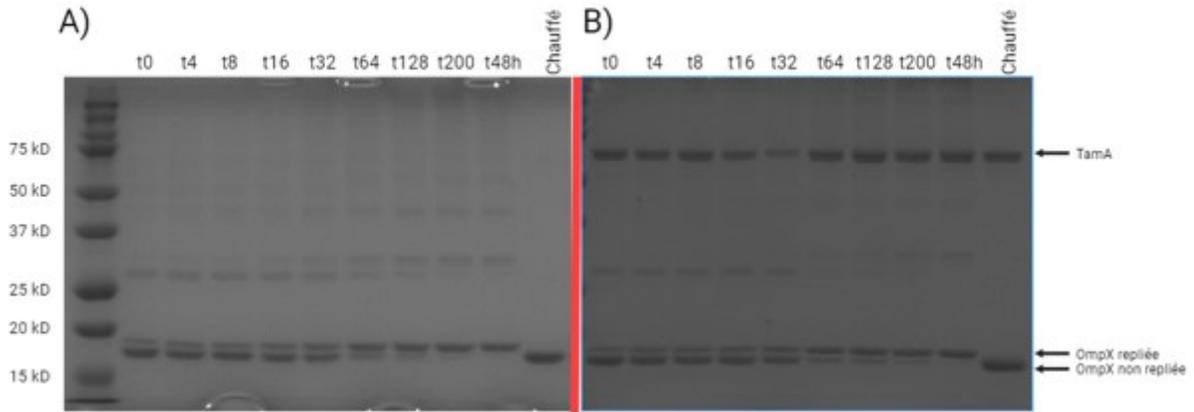
TamA et ses mutants, qui ont été modifiées pour inclure une étiquette polyhistidine, ont été surexprimées à l'aide d'IPTG et laissées en croissance pendant une nuit. Les cellules ont été récoltées, remises en suspension et lysées par sonication. Le lysat a ensuite été filtré et incubé avec de la résine Ni-NTA. La solution a été versée dans une colonne et la protéine a été éluée sur un gradient d'imidazole. La majorité de la TamA a été éluée dans la fraction d'imidazole 150 mM. La fraction a été incubée pendant une nuit avec la protéase TEV afin d'éliminer l'étiquette polyhistidine, qui n'était plus nécessaire. L'élimination complète de l'étiquette est confirmée par un gel SDS-PAGE à 12%. La bande de protéine, après clivage, apparaît à une position plus basse car elle a un poids moléculaire plus faible. La bande est complètement déplacée, ce qui indique que toutes les protéines ont été entièrement clivées (Fig. 8.1a). Bien que certains contaminants soient présents, leur différence de taille est suffisamment importante pour qu'ils puissent être séparés par filtration sur gel. La chromatographie par exclusion de taille est utilisée pour purifier davantage l'échantillon de protéines. Le pic dominant de TamA est entouré de pics plus petits qui seraient des contaminants (Fig. 8.1b).

Pour s'assurer de la pureté de la TamA, des gels SDS-Page sont utilisés pour faire migrer des échantillons du pic. Une bande prononcée correspondant à TamA est observée, ainsi que plusieurs bandes plus petites identifiées comme des contaminants. Dans la plupart des puits, la bande de TamA est nettement plus importante, ce qui indique une concentration plus élevée de TamA que de contaminants et donc la quantité de contaminant sera tolérable. Cependant, étant donné que la bande est si large qu'elle pourrait cacher des contaminants, il pourrait être utile de refaire le test avec des échantillons dilués (Fig. 8.1c).

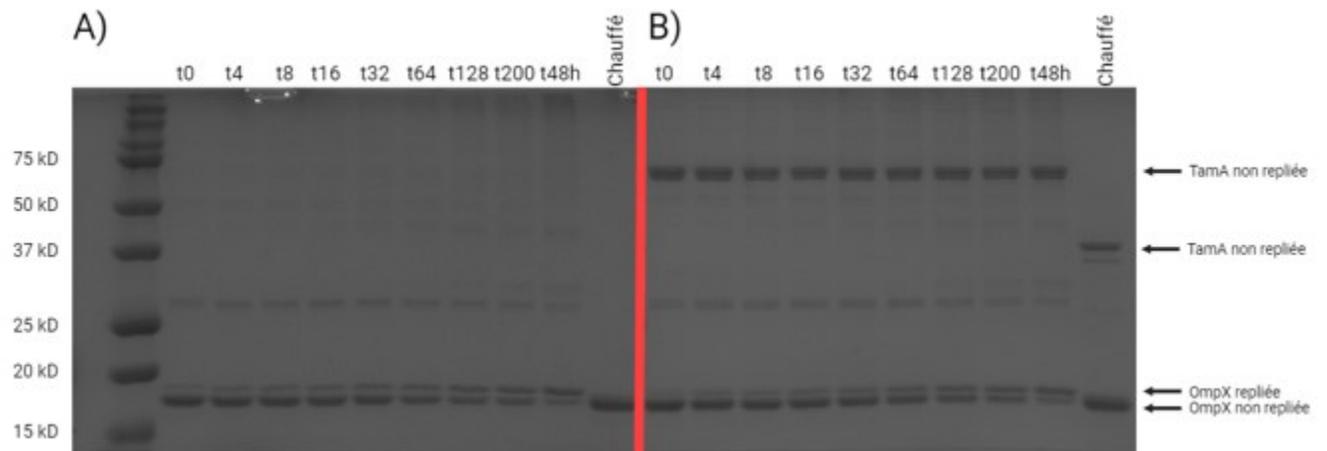


**Figure 8.1 : Purification de TamA.** (A) Vérification du clivage de la queue polyhistidine par la protéase TEV sur gel polyacrylamide à 12%. NC sont des échantillons de TamA sans TEV et C sont des échantillons de TamA incubés avec TEV pendant une nuit à température ambiante. (B) Chromatogramme de la purification de TamA par chromatographie d'exclusion de taille. (C) Électrophorèse du pic de TamA sur gel polyacrylamide à 12%. B10-C9 sont les puits dans lesquels le pic est élué.

## 8.2 Gels SDS-PAGE des tests d'activité insertase de OmpX dans des liposomes de composition lipidiques différentes



**Figure 8.2 : Repliement intrinsèque et catalysé par TamA de OmpX dans des liposomes PC10.** Des liposomes préparés à partir de PC10 sans TamA (A) et avec TamA (B) ont été incubés avec OmpX dénaturé au guanidinium. Des échantillons ont été prélevés à des intervalles réguliers et analysés par SDS-PAGE à 12%. Les échantillons n'ont pas été dénaturés par la chaleur avant l'analyse. Le marqueur de protéines "Dual Color Precision Plus" a été utilisé. Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie et décolorés avec de l'eau. Les concentrations finales des composants sont les suivantes : [TamA] = 4  $\mu$ M, [OmpX] = 4  $\mu$ M et [Liposome] = 3.2 mM. Le profil similaire des deux gels suggère que TamA n'a pas eu d'effet sur le repliement d'OmpX.



**Figure 8.3 : Repliement intrinsèque et catalysé par TamA de OmpX dans des liposomes 80 % PC10 + 20 % PE10.** Des liposomes composés de 80 % PC10 + 20 % PE10 sans TamA (A) et avec TamA (B) ont été incubés avec OmpX dénaturée au guanidinium. Des échantillons ont été prélevés à des intervalles réguliers et analysés par SDS-PAGE à 12%. Les échantillons n'ont pas été dénaturés par la chaleur avant l'analyse. Le marqueur de protéines "Dual Color Precision Plus" a été utilisé. Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie et décolorés avec de l'eau. Les concentrations finales des composants sont les suivantes : [TamA] = 4  $\mu$ M, [OmpX] = 4  $\mu$ M et [Liposome] = 3.2 mM. Le profil similaire des deux gels suggère que TamA n'a pas eu d'effet sur le repliement d'OmpX

### 8.3 Contribution à un manuscrit en préparation

Pendant mes études de maîtrise, j'ai contribué au manuscrit ci-dessous en produisant et en purifiant des protéines recombinantes. Il s'agissait de différentes constructions comprenant un ou plusieurs domaines POTRA de TamA : POTRA-1, POTRA-2/3 et POTRA-1/2/3. Mon rôle dans ce projet a été de suivre rigoureusement les protocoles établis pour l'expression et la purification des protéines, dans le but de produire des échantillons de haute qualité à utiliser pour mesurer l'adsorption des protéines dans les monocouches.

1           **POTRA domains of the TamA insertase interact with the outer**  
2           **membrane and modulate membrane properties.**

3  
4           *Short title: TamA POTRA domains interact with lipid membranes*

5  
6   Abdelkader Mellouk<sup>1,2</sup>, Paul Louis Jaouen<sup>2,3</sup>, Louis-Jacques Ruel<sup>2,4</sup>, Michel Lê<sup>1,2</sup>, Cyrielle Martini<sup>1,2</sup>,  
7   Trevor F. Moraes<sup>5</sup>, Majida El Bakkouri<sup>6</sup>, Patrick Lagüe<sup>2,4</sup>, Elodie Boisselier<sup>2,3</sup>, Charles Calmettes<sup>1,2,#</sup>

8  
9  
10   <sup>1</sup> Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Centre Armand-Frappier Santé  
11    Biotechnologie, Université du Québec, Institut Pasteur International Network, Laval, QC, Canada

12   <sup>2</sup> PROTEO, the Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering,  
13    Montreal, QC, Canada

14   <sup>3</sup> Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology and Otolaryngology – Head and Neck Surgery,  
15    CHU de Québec Research Center, Université Laval, Québec, Canada.

16   <sup>4</sup> Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique and Institut de Biologie  
17    Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC, Canada.

18   <sup>5</sup> Department of Biochemistry, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

19   <sup>6</sup> National Research Council Canada, Human Health Therapeutics, Montreal, QC, Canada

20  
21   # Corresponding author

22   E-mail: charles.calmettes@inrs.ca (CC)

23  
24   **(Figure captions, legends and supplementary figures are grouped at the end of the**  
25   **manuscript)**

26 **ABSTRACT**

27 The outer membrane (OM) of gram-negative bacteria serves as a vital organelle that is densely  
28 populated with outer membrane proteins (OMPs) and plays pivotal roles in cellular and virulence  
29 functions. The assembly and insertion of these OMPs into the OM represents a fundamental process  
30 necessitating dedicated molecular chaperones, exemplified by the translocation and assembly module  
31 (TAM), which serves as a transenvelope chaperone for the folding of specific autotransporters,  
32 adhesins, and secretion systems. The catalytic unit of TAM, TamA, comprises a catalytic  $\beta$ -barrel  
33 domain anchored within the OM and three periplasmic POTRA domains that recruit the TamB  
34 subunit. The latter acts as a periplasmic ladder that aids in the transport of unfolded OMPs across the  
35 periplasm. Initially thought to play a passive role in the assembly process, the POTRA domains were  
36 revealed in this study to interact with the inner surface of the OM, ultimately modulating the  
37 membrane properties to facilitate OMP assembly. Through the integration of X-ray crystallography,  
38 molecular dynamic simulations, and biomolecular interaction methodologies, we located the  
39 membrane-binding site on the first and second POTRA domains, identifying seven polar amino acids  
40 crucial for the specific recruitment of phosphatidylglycerol lipids. In the context of the densely OMP-  
41 populated membrane, this association may serve as a mechanism to secure lipid accessibility for  
42 nascent OMPs through steric interactions with existing OMPs, in addition to creating favorable  
43 conditions for OMP biogenesis by recruiting phosphatidylglycerol lipids near the OMP assembly site.

44

45 **IMPORTANCE**

46 TamA is the catalytic core of the Translocation and Assembly Module, a transenvelope complex  
47 facilitating the assembly of specific outer-membrane proteins (OMPs) in gram-negative bacteria.  
48 Concealing its catalytic site within the membrane  $\beta$ -barrel domain, TamA extends three POTRA

49 domains into the periplasm. Initially considered structural elements responsible for recruiting the  
50 auxiliary protein TamB, the POTRA domains were revealed to actively participate in OMP assembly  
51 by modulating membrane properties. Exploring the conformational landscape of the POTRAs, we  
52 uncovered a membrane-binding site mediating the enrichment of phosphatidylglycerol near the active  
53 site, providing a conducive environment for OMP assembly. This discovery reveals a new function  
54 of the POTRA domain, enriching our molecular understanding of the critical assembly of virulence  
55 factors in pathogenic bacteria processed by TamA.

56

## 57 **INTRODUCTION**

58 A promising target for combating gram-negative bacteria is the critical bacterial envelope,  
59 which includes conserved molecular machines such as the  $\beta$ -Barrel Assembly Machinery (BAM) and  
60 Translocation and Assembly Module (TAM) involved in its biogenesis<sup>1-3</sup>. The outer membrane (OM)  
61 primarily comprises outer membrane proteins (OMPs), which are embedded within the membrane  
62 via a  $\beta$ -barrel domain<sup>4</sup>. These proteins participate in a variety of essential functions, such as cell  
63 division, nutrient uptake, mobility and signaling, and govern host-pathogen interactions, significantly  
64 contributing to adhesion, immune evasion, and toxin delivery<sup>5</sup>. Notably, the OMPs are assembled by  
65 the BAM, which is composed of the essential and ubiquitous BamA catalytic subunit accompanied  
66 by an assortment of different auxiliary lipoproteins whose composition varies from one bacterial  
67 species to another. The best characterized system is the BamABCDE complex in *Escherichia coli*<sup>6</sup>.

68 Although all OMPs require BAM for their assembly, a distinct subset of OMPs, such as the  
69 autotransporter Ag43, adhesins FdeC and intimin, the efflux pump TolC, and the usher protein FimD,  
70 relies on an additional chaperone machinery known as the Translocation and Assembly Module  
71 (TAM)<sup>7-11</sup>. The TAM consists of two interacting proteins, TamA and TamB, which associate with

72 one another to form a trans-envelope machinery, facilitating the assembly of specific OMP clients<sup>12</sup>.  
73 TamA resembles BamA and is the outer membrane subunit, while TamB is a large inner membrane  
74 protein assisting in the transit of unfolded OMP substrates across the periplasm. The deletion of *tamA*  
75 or *tamB* is associated with reduced virulence or colonization potential in various bacterial pathogens,  
76 a phenotype attributed to the improper assembly of outer membrane virulence factors<sup>3,13</sup>. TAM was  
77 discovered more recently than the ubiquitous BAM system and has received less attention. Therefore,  
78 our understanding of TAM has been limited, and the functional model of TamA has been based  
79 mainly on knowledge gained from its BamA counterpart. These proteins belong to the OMP85 family  
80 and possess a unique  $\beta$ -barrel that opens into the membrane along its seam ( $\beta 1$ - $\beta 16$ )<sup>14-17</sup>. This lateral  
81 gate is dynamic and has been shown to interact with OMP substrates. Notably, the gate influences the  
82 insertion of proteins into the OM by disordering nearby lipids, while providing incoming OMP clients  
83 with access to the hydrophobic core of the OM<sup>18</sup>. This intricate process is supported by auxiliary Bam  
84 proteins and further assisted by the exceptionally thin hydrophobic belt surrounding the lateral gate,  
85 which exerts localized bending stresses on the membrane. The folding mechanism derived from  
86 studies regarding BAM involves the formation of a transient hybrid BamA-OMP barrel at the lateral  
87 gate, which eventually dissociates to release the newly assembled  $\beta$ -barrel in the OM<sup>19</sup>.

88 Another key architecture of OMP85 proteins resides in the amino-terminal domain, which  
89 comprises periplasmic repeats of polypeptide-transport-associated (POTRA) domains. The number  
90 of POTRA domains varies within the OMP85 family, with BamA and TamA possessing five and  
91 three POTRA domains, respectively<sup>20,21</sup>. The structures of the BamABCDE complex offer valuable  
92 insights into the function of POTRA domains as anchor points, enabling the recruitment of auxiliary  
93 Bam proteins that facilitate conformational changes within BamA's lateral gate<sup>22,23</sup>. In the case of  
94 TamA, POTRA-1 is required for the formation of TAMs by sequestering the carboxy-terminal tail of

95 TamB in vitro<sup>12</sup>. Furthermore, the complete removal of all POTRA domains has been shown to  
96 abolish the chaperone function of TamA in *E. coli*<sup>17</sup>.

97 Although TAM shares multiple similarities with BAM, it also introduces unique characteristics  
98 exemplified by a trans-envelope architecture (vs. the OM-centric BAM complex), a reliance on BAM-  
99 unrelated auxiliary protein, and a disparate POTRA domain layout (horizontally toward the  
100 membrane) that imply evolutionary differentiation in the mechanism, specificity, and regulation of  
101 TAM. These unique traits remain open questions in the field, particularly concerning their potential  
102 contribution to the insertase function of TamA. The present study focused on elucidating the function  
103 of the unique croissant-shaped organization of the POTRA domains in TamA (**Figure S1**), which is  
104 characterized by a distinctly prolonged architecture parallel to the membrane — a domain  
105 arrangement that appears flexible based on novel crystal structures of TamA obtained from the  
106 opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Indeed, the conformational landscape of *Pa*TamA,  
107 solved in three different space groups, unveils the dynamic nature of its POTRA domains and  
108 suggests a mechanism by which the POTRA arm associates with the OM to modulate its properties.

109 In support of this hypothesis, certain bacterial phyla, such as *Bacteroidetes* and *Chlorobiota*, encode  
110 a lipidated TamA variant called TamL, which incorporates a lipid anchor at the amino terminal region  
111 of the POTRA-1 domain<sup>20</sup>. To further explore the POTRA-membrane interactions, we applied in  
112 silico molecular dynamics (MD) simulations and orthogonal biophysical approaches. Our data  
113 provide compelling evidence that the periplasmic domain of TamA can directly associate with the  
114 inner leaflet of the OM through a series of polar amino acids (Arg/Lys) lining the POTRA-12  
115 domains. The membrane associations with POTRA preferentially recruit unsaturated  
116 phosphatidylglycerol (PG) when associated with the membrane, leading to a discernable impact on  
117 the phase transition temperature. This interaction likely plays a role in recruiting and sustaining a

118 favorable lipid environment, thereby facilitating the insertion of OMP substrates into a fluidic state  
119 membrane enriched in PG lipids. This process simultaneously creates room for the incoming nascent  
120 OMP to fold into the membrane, which is densely packed with preexisting OMPs<sup>24,25</sup>. Taken together,  
121 these findings offer new insights into the molecular mechanism underlying the function of TamA and  
122 contribute to a deeper understanding of how the POTRA domains participate in OM biogenesis and  
123 influence the membrane environment.

124

## 125 **RESULTS**

### 126 *The TamA structure suggests POTRA-membrane interactions*

127 The structure of TamA was previously solved in bicelles from the model organism *E. coli*<sup>15</sup>.  
128 To further explore the structural and conformational landscape of TamA, we attempted to elucidate  
129 additional structures using other bacterial models. Successful crystallization was achieved with the  
130 *P. aeruginosa* TamA homolog (*Pa*TamA) in C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> detergent, sharing 34% sequence identity with  
131 *Ec*TamA. The expression and purification of *Pa*TamA were accomplished with high purity and  
132 homogeneity, yielding 10 mg of protein per liter of culture. Several crystal forms of full-length  
133 *Pa*TamA were collected from space groups C222, P22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> and P2<sub>1</sub>, with the best crystals diffracting  
134 to 2.6 Å resolution using selenoderivative *Pa*TamA proteins. The *Pa*TamA structures maintain the  
135 overall architecture observed in *Ec*TamA, harboring a carboxy-terminal β-barrel domain occluded by  
136 an extracellular loop to enclose a hydrophilic cavity partially opened on the inner leaflet of the OM  
137 **(Figure 1A)**. Like BamA, TamA exhibits an atypical cracked-barrel architecture, lacking hydrogen  
138 bonds between strands 1 and 16, which loosely associate to create access from the barrel lumen to the  
139 hydrophobic lipid phase. The open seam in *Pa*TamA corresponds to a narrow 11 Å hydrophobic  
140 region and is likely involved in membrane perturbation at the substrate insertion site **(Figure 1B-C)**.

141 These unique traits shared by BamA and TamA are proposed to locally disorder the membrane at the  
142 seam of the chaperone barrel, where the lateral gate provides a seeding template for the assembly of  
143 incoming OMP substrates by sequential  $\beta$ -augmentation events.

144 The three POTRA domains are exposed to the periplasm and anchored to the membrane by  
145 the carboxy-terminal barrel domain. This POTRA arm adopts a croissant-shaped arrangement,  
146 extending 80 Å parallel to the membrane, with the amino terminus oriented toward the OM. The  
147 multiple *Pa*TamA crystal structures display the dynamic nature of the POTRA domains, allowing  
148 significant movements that enable these domains to rearrange toward or away from the OM (**Figure**  
149 **2A**). Our various structures illustrate a variety of *Pa*TamA conformations, positioning the POTRA-1  
150 domain at distances ranging from 17 to 2 Å in relation to the hydrophilic headgroups of the OM; the  
151 published *Ec*TamA structure locates the POTRA-1 domain 20 Å away from the membrane.  
152 Additionally, the orientations of the three POTRA domains are flexible, permitting conformational  
153 adaptability between adjacent POTRA domains. These two extreme conformations represent a  
154 possible reorganization adopted by the TAM during OMP assembly. This hypothesis is consistent  
155 with the findings of an earlier biophysical study using magnetic contrast neutron reflectometry, which  
156 identified two TamA conformers exhibiting significant vertical amplitude movement (up to 70 Å)  
157 upon substrate binding to POTRA-12<sup>9,12,26</sup>. POTRA-1 appears to be the most mobile element, as  
158 indicated by its higher B-factor values, and lack of electron density in the C2 space group (**Figure**  
159 **2B**). This structural flexibility suggests that the POTRA domains of TamA could reach the inner  
160 surface of the OM and maintain interactions with the polar head groups of phospholipids. This  
161 hypothesis is further supported by the evolutionary occurrence of a TamL homolog in the  
162 *Bacteroidetes* and *Chlorobiota* phyla (still part of an operon with *tamB*), which encodes a lipidated  
163 version of TamA at its POTRA-1 amino-terminal residue and is likely to sequester the POTRA

164 domains on the OM<sup>20</sup>. To explore the concept of specialized functions associated with the POTRA  
165 domains of TamA and TamL, we performed a comparative analysis of these domains within the BAM  
166 and TAM systems. Utilizing cluster analysis of sequences (CLANS)<sup>27</sup>, our objective was to uncover  
167 potential differences or similarities among these systems. To this end, we aimed to broaden the scope  
168 of the previous analysis<sup>12</sup> by incorporating a more extensive representation of sequences  
169 encompassing most bacterial lineages that encode the *tamA* or *tamL* gene. While the POTRA-3  
170 domain of the TAM system exhibits notable similarities to that of the BAM system, a divergence  
171 emerges between the POTRA-1 and POTRA-2 domains of the TamA/TamL proteins and  
172 corresponding BamA domains. This divergence alludes to a potential functional differentiation  
173 between the two systems that could drive the assembly of a trans-envelope complex with TamB<sup>12</sup>  
174 and/or promote proximal interaction with the OM.

175

### 176 *The POTRA1 and POTRA2 domains partition onto the membrane according to molecular dynamic* 177 *simulations*

178 To investigate the potential interactions between POTRA domains and the bacterial  
179 membrane, we conducted three independent 1- $\mu$ s molecular dynamic (MD) simulation trajectories of  
180 the TamA protein in a POPE:POPG (80:20) bilayer, which was designed to mimic the lipid  
181 composition of the inner leaflet. Although the TamA transmembrane barrel was in the bilayer, the  
182 initial position of the POTRA-12 arm was set at least 20 Å from the bilayer surface. However, during  
183 the MD trajectories, we observed rapid repositioning of the POTRA-1 and POTRA-2 domains,  
184 bringing them closer to the bilayer interface (**Figure 3A and S2**). This association with the membrane  
185 interface did not cause any major reorganization of the secondary structure in the POTRA domains,  
186 as indicated by the RMSD values, which remained below 2.5 Å throughout the simulations (**Fig. S3**).

187 Moreover, the secondary structure of the POTRA domains remained conserved in the presence of the  
188 lipid bilayer, as confirmed by the superposition of the final conformation of the domains onto their  
189 respective experimental structures (**Figure S3**).

190 The dynamics of the interactions between the POTRA residues and the lipid components are  
191 reported in **Figure 3B**. Specifically, we analyzed the contact times between the POTRA domains and  
192 the lipid polar head groups as well as the lipid aliphatic chains. All three simulations converged to a  
193 common binding interface, primarily involving interactions of the POTRA arm with the bilayer  
194 through the POTRA-1 domain, followed by the POTRA-2 domain. However, minimal interactions  
195 occurred between the POTRA-3 domain and the membrane. The predominant interactions between  
196 the POTRA-12 domains and the membrane bilayer were essentially mediated by lipid polar heads.  
197 Notably, specific residues, such as Arg31, Lys40, Lys88 and Arg106 from POTRA-1 and Lys130  
198 and Lys137 from POTRA-2, exhibited the highest relative contact times with lipid polar heads. This  
199 observation aligns with the involvement of lysine and arginine residues, which are frequently present  
200 in the coordination sphere of the phosphate moiety in protein/phospholipid complexes. Furthermore,  
201 a few residues also exhibited significant interactions with lipid aliphatic chains, including Arg31 and  
202 Ala35 from POTRA-1 and Lys130 from POTRA-2, which exhibited the highest relative contact times  
203 with lipid aliphatic chains.

204

### 205 *TamA POTRA domains interact with lipid membranes*

206 To investigate the putative interaction between the inner surface of the OM and the POTRA  
207 domains, we performed microscale thermophoresis experiments to measure the binding affinities  
208 between soluble POTRA constructs and calibrated liposomes as a lipid bilayer model. To mimic the  
209 bacterial membrane, we generated fluorescence-labeled liposomes composed of polar lipid extracts

210 of *E. coli* (comprised of 65.3% PE, 22.6% PG and 9.8% cardiolipin) and 2.5% 1,2-dioleoyl-sn-  
211 glycerol-3-phosphoethanolamine-N-(cyanine 5) or Cy5-PE (C18:1) as a fluorescence label (**Figure**  
212 **4A**). The purity and homogeneity of the vesicular membrane model were confirmed using a  
213 nanoparticle tracking analyzer on 100 nm-long extruded liposomes (**Figure 4B and S5**). A series of  
214 POTRA domain constructs were engineered to investigate the binding contributions of individual  
215 domains. POTRA-1, POTRA-23 and POTRA-123 were successfully expressed and purified with  
216 high yields of pure protein. However, the expression of the POTRA-2, POTRA-3 and POTRA-12  
217 domains led to the formation of inclusion bodies; thus, these proteins were not included in the binding  
218 assay. **Figure 4E** shows the direct associations between POTRA domains and vesicle membranes,  
219 with dissociation constants in the range of 3.09, 0.36, and 0.47  $\mu\text{M}$  for POTRA-123, POTRA-1 and  
220 POTRA-23, respectively. To validate the binding interface predicted by MD simulations, we selected  
221 seven amino acids with a high residency time at the membrane surface, for which we anticipated that  
222 point mutations would decrease or abrogate membrane interactions (**Figure 4C and S4**). These seven  
223 lysine and arginine residues (R31, K40, K88, K94, R106, K130 and K137) are located on the POTRA-  
224 12 domains and were chosen based on their calculated residency times to the membrane during MD  
225 simulations. The alanine mutant construct (mut-POTRA-123) was subsequently produced to  
226 homogeneity and evaluated by binding titration assays via microscale thermophoresis. In agreement  
227 with our MD simulation models, the septuple alanine mutations introduced at the predicted lipid  
228 interface displace the binding equilibrium, resulting in a significant loss of binding while retaining  
229 nearly identical stability properties compared to those of the wild-type POTRA-123 domain (**Figure**  
230 **4D-E**). Although the mutated protein displays residual membrane-binding activity (two or more  
231 orders of magnitude lower), its dissociation constant could not be precisely determined because the  
232 titration curve reached the maximum solubility threshold for the protein. Taken together, these results

233 validate the membrane association of the POTRA arm, as predicted by the MD simulations, which  
234 designate POTRA-1 and -2 as peripheral membrane domains. Accordingly, the liposome binding  
235 assay identified POTRA-1 as the main attraction force, with contributions from POTRA-2, as  
236 suggested by the lack of membrane interaction with the septuple alanine mutant debilitating the  
237 putative binding interface in the POTRA-12 domains.

238         Considering the variety of phospholipids populating the OM, the interaction between the  
239 POTRA domains and the membrane could favor a certain type of phospholipid. To determine the  
240 preferences of the POTRA domains, we formulated alternative liposome compositions to assess the  
241 individual contributions of specific phospholipid polar head groups according to their intrinsic  
242 physicochemical properties. Unfortunately, these liposome formulations enriched in  
243 phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylglycerol (PG) were unstable in the presence of Cy5-  
244 PE (C18:1). Hence, we introduced up to 80% phosphatidylcholine (virtually absent in prokaryotic  
245 membranes) in our formulation because it is a generic component facilitating the formation of lipid  
246 vesicles; however, these liposomes still exhibited substantial heterogeneity, which made them  
247 noncompliant with microscale thermophoresis (**Figure S5**). To overcome incompatibility issues in  
248 lipid formulation, a monolayer membrane model was used to investigate the specific contribution of  
249 phospholipids at the POTRA/membrane interface.

250

### 251 *TamA POTRA domains selectively interact with unsaturated PE and PG lipids*

252         The Langmuir monolayer model serves as a versatile tool for emulating a physiological cell  
253 membrane by generating a membrane leaflet with comparable mechanical and thermodynamic  
254 properties<sup>28,29</sup>. This model is particularly well suited for mimicking the intricate environment of the  
255 inner leaflet due to the asymmetrical distribution of lipids within the OM. It allows for the creation

256 of homogeneous and planar lipid membranes while affording control over a spectrum of parameters  
257 encompassing lipid composition, physical states, subphase constituents, pH, temperature, and surface  
258 tension<sup>30</sup>. In this study, a selection of phospholipids was used, including zwitterionic PE lipids and  
259 negative PG lipids such as DPPE (*diC16:0* PE), DOPE (*diC18:1* PE), DPPG (*diC16:0* PG) and DOPG  
260 (*diC18:1* PG). These choices were deliberately made to accurately mirror the native composition of  
261 the inner leaflet in the OM of gram-negative bacteria<sup>31</sup>. They were also chosen for their ability to  
262 represent a range of characteristics that influence protein-membrane interactions, such as the size and  
263 charge of the polar head, the length of the acyl chain, and the degree of unsaturation, all of which  
264 impact the physical properties of the membrane<sup>32</sup>.

265 We probed the interactions of the POTRA-1, POTRA-23, and POTRA-123 constructs with  
266 saturated DPPE and DPPG lipids under ordered gel phase conditions (the phase transition  
267 temperatures of DPPE and DPPG are 63 °C and 41 °C, respectively), revealing comparable maximum  
268 insertion pressure (MIP) values at saturating protein concentrations with a predilection for  
269 zwitterionic DPPE lipids (approximately 38 and 32 mN/m for DPPE and DPPG lipids, respectively)  
270 **(Figures 5 and S6)**. These interactions with the membrane were associated with higher synergy  
271 values for the POTRA-23 and POTRA-123 domains. In contrast, when testing unsaturated DOPE and  
272 DOPG lipids, POTRA-1 consistently exhibited higher MIP values than did POTRA-23 and POTRA-  
273 123 (42 and 53 mN/M for DOPE and DOPG, respectively), with notably high synergy values above  
274 0.5 toward DOPG. Collectively, these results underscore the binding preference of the POTRA  
275 domains for associating with lipids in disordered liquid crystalline phase membranes (the phase  
276 transition temperatures of DOPE and DOPG are -16 °C and -18 °C, respectively), which more  
277 accurately represents the natural state of biological membranes. These interactions are dominated by  
278 the strong affinity between the POTRA-1 domain and PG head groups in the disordered membrane,

279 as indicated by the large MIP and synergy values of POTRA-1 and DOPG, which exceeded 50 mN/m  
280 and 0.5, respectively (**Figure S6**). This strong interaction might conceivably denote physiological  
281 significance, given that PG constitutes the second most prevalent constituent (~20%) of the inner  
282 leaflet following PE (~75%)<sup>33</sup>. Moreover, their roles have been previously demonstrated to facilitate  
283 OMP assembly over PE lipids in a liposome model<sup>34,35</sup>.

284 In the presence of mixed lipid membranes composed of a POPE/POPG mixture (80/20 ratio)  
285 or *E. coli* polar lipids, the MIP values of all three constructs were comparable. However, the three  
286 constructs demonstrated a greater preference for the POPE/POPG mixture than for the *E. coli*  
287 membrane extract, substantiated by their higher MIP and synergy values (**Figure 5A and S6**). This  
288 phenomenon can be attributed to the composition of the polar lipids in *E. coli*, which comprise blends  
289 of lipids from both the outer and inner membranes. This is different from the POPE/POPG mixture,  
290 which closely mimics the inner leaflet of the OM. These observations support earlier observations, in  
291 which the POTRA-1 domain predominantly influenced the MIP values, while the POTRA-23  
292 domains primarily contributed to the synergy values. This finding suggests that POTRA-1 is engaged  
293 in membrane binding, whereas the POTRA-23 arm participates in enhancing membrane affinity,  
294 positioning itself in closer proximity to the membrane prior to consolidating interactions with  
295 POTRA-1.

296 To corroborate and crossvalidate the identification of the lipid binding interface on the  
297 POTRA-12 region, we introduced the septuple mutant mut-POTRA-123 and evaluated its interactions  
298 with DOPG and POPE/POPG membranes. The mutations resulted in a substantial reduction in both  
299 the MIP and synergy values when compared to those of the wild-type construct. This outcome aligns  
300 with our molecular dynamics and microscale thermophoresis data, reinforcing the pivotal role of the

301 mutated amino acids (R31, K40, K88, K94, R106, K130 and K137) in facilitating the interaction  
302 between the POTRA domains and the membrane.

303

#### 304 *The TamA POTRA domain modulates lipid bilayer properties*

305 In contrast to conventional protein–protein interactions, protein–membrane surface  
306 interactions represent a relatively unexplored domain, owing to technical challenges that need to be  
307 surmounted. Nonetheless, the limited studies conducted in this area, particularly regarding peripheral  
308 membrane proteins, provide evidence that protein interactions can locally modulate the physical and  
309 dynamic properties of the membrane<sup>36–38</sup>. To explore the impact of POTRA/membrane interactions  
310 on global bilayer equilibrium, we evaluated membrane fluidity by measuring the phase transition  
311 temperature ( $T_m$ ) of the membrane in the presence and absence of different POTRA constructs. For  
312 this purpose, we used a Laurdan fluorescence probe, which emits varying signals depending on  
313 whether the lipid phase state is in a gel or liquid form<sup>39</sup>, exhibiting blueshifted fluorescence when  
314 lipids are in a more packed phase (**Figure 6**). For this assay, we selected DMPG (*di*C14:0 PG) and  
315 POPE (C16:0-C18:1 PE) lipids because their phase transition temperatures (23 °C and 25 °C,  
316 respectively) fall within the measurable range of our experimental setup; furthermore, both PG and  
317 PE lipid membranes associate with the POTRA arm (**Figure 5**). In the absence of the POTRA arm,  
318 the measured  $T_m$  values aligned with the theoretical  $T_m$  values of DMPG membranes at 23 °C  
319 (**Figure 6B**). However, when DMPG liposomes were incubated with PG-interacting POTRA  
320 constructs (POTRA-1, POTRA-23 and POTRA-123), a 1 °C increase was consistently observed,  
321 indicating that the POTRA domain contributes to the physical stabilization of the lipid bilayer. This  
322 stabilization was not observed for the POPE membranes. Interestingly, the septuple mutant (mut-  
323 POTRA-123), which possesses an altered binding site, had no influence on membrane fluidity. This

324 observation suggests that the stabilization of the DMPG bilayer is specifically dependent on the  
325 binding interface with a functional POTRA domain. The decrease in membrane fluidity for DMPG  
326 can be attributed to the restricted lateral diffusion of PG, arising from interactions with the POTRA  
327 domain. This binding interaction with PG lipids, along with their constrained diffusion, is likely to  
328 sustain a localized enrichment of PG lipids near the lateral gate. This accumulation is anticipated to  
329 promote a more conducive environment for OMP folding, given the positive correlation between  
330 OMP assembly and the accumulation of PG and the local distribution of negative charges across the  
331 membrane (LPS and PG), which collectively contribute to lowering the kinetic barrier for OMP  
332 assembly<sup>34,35,40</sup>.

333

334

## 335 **DISCUSSION**

336 In gram-negative bacteria, the catalytic units BamA and TamA play pivotal roles in the  
337 insertion and assembly of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins. These processes occur through parallel  
338 pathways denoted as BAM and TAM, respectively. Both BamA and TamA are members of the  
339 OMP85 family of proteins; they share strong structural homology in terms of their  $\beta$ -barrel  
340 configuration and are thought to function via a conserved gating mechanism. While TamA is not  
341 essential, it is nonetheless vital for preserving membrane integrity and orchestrating the assembly of  
342 specific virulence factors. Notably, the deletion of *tamA* in multidrug-resistant pathogens such as  
343 *Klebsiella pneumoniae* and *Edwardsiella tarda* results in increased antibiotic susceptibility and  
344 diminished virulence. Considering the significance of TamA in pathogenic species, the translocation  
345 and assembly module has emerged as a pertinent candidate for the development of anti-infective  
346 agents, thereby emphasizing the imperative need to unravel its intricate molecular mechanism<sup>3,13</sup>. To

347 further understand how TamA operates, particularly within infectious microorganisms, we solved its  
348 crystal structure from a pathogenic *P. aeruginosa* strain in three distinct conformations. In stark  
349 contrast to the preceding *E. coli* structure, these structures illustrate the dynamic nature of the POTRA  
350 domains, operating as a rigid lever arm capable of considerable vertical motion (**Figure 2**). Our  
351 structural observation aligns with earlier magnetic contrast neutron reflectometry data, pointing to the  
352 existence of two extreme lever-arm conformers upon substrate binding to TamA<sup>12,26</sup>. This  
353 transformation within the protein's conformational landscape is notably permitted by the flexible  
354 junction between the  $\beta$ -barrel and POTRA-3 domains. This proximity to the membrane was not  
355 initially observed in the *Ec*TamA structure, as the POTRAs were constrained to an extended  
356 conformation within the crystal lattice<sup>15</sup>. Using molecular dynamics simulations, we further explored  
357 the behavior of *Pa*TamA, confirming the ability of the POTRA domains to approach the membrane  
358 closely and engage with lipid headgroups through a series of polar amino acids lining the POTRA-1  
359 and POTRA-2 domains (**Figure 3**). To validate these predictions, we quantified the dissociation  
360 constant between lipid vesicles (*E. coli* lipids) and various POTRA constructs, revealing binding  
361 events within the nanomolar range. Moreover, these interactions were corroborated in a lipid  
362 monolayer model, demonstrating the versatile capacity of the POTRA arm to interact with curved  
363 and flat membrane surfaces (**Figures 4 and 5**). The insights gained from the molecular dynamic  
364 simulations were instrumental in pinpointing the interface responsible for membrane binding, as well  
365 as delineating the amino acids within POTRA-1 and POTRA-2 responsible for mediating adhesion  
366 with the inner leaflet of the OM. Accordingly, mutations in these amino acids  
367 (R31/K40/K88/K94/R106/K130/K137) led to a marked reduction in binding affinity, as evidenced  
368 by both monolayer and bilayer membrane models, confirming their importance in maintaining  
369 interactions with the bacterial membrane.

370 The periplasmic leaflet of the OM in gram-negative bacteria primarily consists of PEs (75%)  
371 and PGs (20%), which have various degrees of unsaturation and acyl chain length<sup>31</sup>. Our monolayer  
372 interaction study showed that the different POTRA domains interact with both neutral and negatively  
373 charged lipid surfaces, comprising PE and PG. However, these interactions are notably enhanced in  
374 the presence of unsaturated PG, which has the highest affinity for POTRA-1 under all tested  
375 conditions. This preference suggests that POTRA domains effectively recruit unsaturated  
376 phospholipids around the  $\beta$ -barrel lateral gate, preferentially leading to PG lipids, which favorably  
377 influence OMP assembly over PE lipids<sup>34,35,40</sup>. Conversely, PE, a major constituent of bacterial  
378 membranes, exerts an inhibitory effect, hindering OMP assembly in liposome membrane models<sup>35</sup>.  
379 This notion is supported by the ability of the POTRA domains to interact with and restrict the  
380 diffusion of PG lipids at their binding interface, substantiating the idea that the POTRA domains  
381 reconfigure the lipid distribution near the lateral gate in favor of PG (**Figure 6**). Moreover, in the  
382 context of densely populated membranes, periplasmic POTRA domains can serve as a steric  
383 exclusion mechanism to facilitate lipid accessibility for the insertion of nascent proteins into an  
384 environment congested with existing OMPs<sup>24,25</sup>. Building upon our discoveries and recent research  
385 on the BAM and TAM chaperones, we present a refined functional model of the TAM machinery  
386 (**Figure 7**). In this model, the POTRA arm assumes a crucial role in regulating TamA insertase  
387 function by interacting with the membrane surface, thereby influencing the local properties of the  
388 OM and facilitating OMP assembly. Briefly, in its resting conformation, the POTRA arm associates  
389 with the outer membrane, promoting the local enrichment of PG lipids near the  $\beta$ -barrel active site.  
390 This interaction excludes existing OMPs, ensuring membrane availability for the insertion of  
391 incoming OMP clients. Upon interaction with the protein substrate, the POTRA arm dissociates from  
392 the membrane, likely imposing structural tension on the  $\beta$ -barrel of TamA. This contributes to the

393 gating mechanism that catalyzes the assembly of the OMP client, similar to the process observed in  
394 BamA with the formation of a transient hybrid barrel by sequential  $\beta$ -augmentations<sup>19,41</sup>. The cycle  
395 progresses until the release of the newly folded protein, followed by the reattachment of TamA  
396 POTRAs to the membrane in the resting conformation. An intriguing question persists in the  
397 functional model of the lipidated TamL variant, as it is less unlikely that the POTRA will dissociate  
398 from the membrane due to the membrane-anchored POTRA-1 domain. An alternative model for  
399 TamL may involve alternating the vertical POTRA motion through rotational movement (along the  
400 membrane plane) upon substrate binding to regulate the gating activity of the catalytic site.  
401 Alternatively, this variant might heavily rely on membrane modification to facilitate OMP assembly,  
402 or it could primarily function to maintain TamB near the outer membrane, facilitating TamB-  
403 dependent lipid transport across the inner and outer membranes in the *Bacteroidetes* and *Chlorobiota*  
404 phyla<sup>42,43</sup>. Additional experiments will be required to refine the current TAM model, especially to  
405 unravel the elements controlling the lateral gate of the TamA. This will necessitate further exploration  
406 through the capture of intermediary conformational states of TAM via X-ray crystallography or cryo-  
407 electron microscopy.

## 408 MATERIALS AND METHODS

### 409 *Materials*

410 The buffer solutions were prepared using deionized water obtained from a Barnstead Nanopure  
411 system (Dubuque, IA, USA). The resistivity and surface tension of the water at 20°C were 18.2  
412 M $\Omega$ ·cm and 72 mN/m, respectively. Tris base and butylated hydroxytoluene were purchased from  
413 Fisher Scientific (Hampton, NH, USA), hydrochloric acid was obtained from VWR International  
414 (Radnor, PA, USA), and potassium phosphate monobasic acid was obtained from VWR International  
415 (Radnor, PA, USA). High-performance liquid chromatography-grade chloroform and methanol were  
416 acquired from Laboratoire Mat (Quebec, Canada). The phospholipids used in the study, including  
417 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-  
418 L-serine (DPPS) (sodium salt), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG)  
419 (sodium salt), 1,2-dipalmitoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-  
420 3-phospho-L-serine (DOPS) (sodium salt), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)  
421 (DOPG) (sodium salt), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1-  
422 palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG) (sodium salt), and *E. coli* Polar  
423 Lipid Extract, were obtained from MilliporeSigma (Burlington, MA, USA). The lipid solutions were  
424 prepared in chloroform and stored at -20°C. Unsaturated lipids were kept under an argon atmosphere  
425 with 5  $\mu$ g/mL of the antioxidant butylated hydroxytoluene, while saturated lipids were stored under  
426 atmospheric air.

427

### 428 *Plasmid cloning*

429 Cloning in this study was performed using the restriction-free cloning method<sup>44</sup>. Briefly, the coding  
430 sequence of the predicted mature TamA protein from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (*PaTamA*<sub>25</sub>-

431 579) was cloned between the BamH1 and Xho1 endonuclease sites of a modified pET20 expression  
432 plasmid and downstream of the PelB signal sequence, hexahistidine tag and TEV cleavage site. The  
433 POTRA domain constructs POTRA-123 (*PaTamA*<sub>25-270</sub>), POTRA-23 (*PaTamA*<sub>105-270</sub>) and POTRA-  
434 1 (*PaTamA*<sub>25-104</sub>) were cloned and inserted into a pNIC-CTHF vector upstream of a hexahistidine tag  
435 and a TEV cleavage site using the same approach. Site-directed mutagenesis was performed using  
436 the whole-plasmid PCR mutagenesis method<sup>45</sup>. Briefly, the pNIC-CTHF-POTRA-123 plasmid was  
437 amplified with a pair of complementary oligonucleotides encoding a selected mutation. After 18  
438 amplification cycles, the methylated parental plasmids were digested by the addition of 10 units of  
439 DpnI for 15 minutes, and the PCR mixture was transformed into *E. coli* SIG10 competent cells prior  
440 to selection on LB agar supplemented with 50 µg/mL kanamycin. Individual colonies were grown in  
441 5 mL of LB media overnight and the plasmids were purified using a QIAGEN miniprep kit prior to  
442 Sanger sequencing to confirm the introduction of the desired mutation. The procedure was reiterated  
443 for the accumulation of additional mutations. The plasmids and oligonucleotides used in this study  
444 are listed in the supplementary table 1.

445

#### 446 ***Expression and purification***

447 Chemically competent *E. coli* BL21 ( $\lambda$  DE3) C43 cells were transformed with the *PaTamA*<sub>25-579</sub>  
448 expression plasmid by heat shock. Cells containing the plasmid of interest were selected by plating  
449 on LB agar in the presence of ampicillin. After the cell had grown in 2YT medium at 37°C to an  
450 OD<sub>600nm</sub> of 1, the temperature was decreased to 30°C, and the expression of *PaTamA* was induced  
451 with 0.5 mM IPTG. After 16 hours of expression, the *E. coli* cells were harvested at 6000 rpm for 15  
452 min, and resuspended in cold lysis buffer (20 mM HEPES pH 8, 0.2 M NaCl, 1% (w/v) Elugent  
453 (Calbiochem), DNase I, MgCl<sub>2</sub>, lysozyme and PMSF) and then lysed by sonication. Cell debris and

454 unbroken cells were pelleted by centrifugation at 16000 rpm for one hour, and the supernatant  
455 containing solubilized TamA was incubated for one hour with 5 mL of Ni-NTA resin under gentle  
456 agitation at 4°C. The bound His<sub>6</sub>-tagged TamA was eluted with step gradients ranging from 20 mM  
457 to 500 mM imidazole in a mobile phase composed of 20 mM HEPES (pH8), 0.2 M NaCl and 0.5%  
458 (w/v) C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>. The protein fractions were pooled and digested with TEV protease at 4°C overnight.  
459 TamA was concentrated to 10 mg/mL and subsequently gel-filtered on a Superdex 200 column (GE  
460 Healthcare) in 20 mM HEPES pH 8, 0.2 M NaCl and 0.5% (w/v) C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>. The Selenomethionine-labeled  
461 *Pa*TamA<sub>25-579</sub> was expressed using the methionine auxotrophic *E. coli* BL21 (DE3) B834 strain  
462 cultured in autoinducible minimal media 5052 supplemented with selenomethionine and was  
463 ultimately purified following the same protocol as the native protein. The four POTRA domain  
464 constructs, POTRA-1, POTRA-23, POTRA-123 and mut-POTRA-123 were overexpressed in *E. coli*  
465 BL21 ( $\lambda$  DE3) in LB media. Bacteria were grown at 37°C to an OD<sub>600nm</sub> of 0.8, prior to overnight  
466 protein induction with 0.5 mM IPTG at 22°C. The cells were harvested by centrifugation and lysed  
467 in 20 mM HEPES pH 8, 0.2 M NaCl, DNase I, MgCl<sub>2</sub>, lysozyme and PMSF. The soluble POTRA  
468 domains were purified with the same method as described above, exception for the use of mobile  
469 phase buffers, which were exempted from detergent. The identity and purity of the protein samples  
470 were evaluated by mass spectrometry and SDS-PAGE analysis.

471

#### 472 ***TamA structure determination***

473 The native and seleno-Met derivative *Pa*TamA<sub>25-579</sub> were concentrated to 10-15 mg/ml using a 100  
474 kDa cutoff centrifugal concentration device. The crystallization drops were set up by vapor diffusion  
475 using the sitting-drop method with a ratio of protein solution to the reservoir of 1:1. Three conditions  
476 yielding diffracting-quality crystals in space groups C222<sub>1</sub> (60% hexylene glycol and 0.1 M HEPES

477 pH 7.4), P2<sub>1</sub> (12% peg 4K, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 mM HEPES pH 7.2, 4% isopropanol, 10% glycerol),  
478 C2 (11% peg 3350, 0.1 M magnesium formate, 70 mM sodium cacodylate pH 6.0), and P22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> (18%  
479 peg 3350, 0.2 M NaI, 0.1 M HEPES pH 8.0) were optimized from multiple hits obtained from the  
480 JCSG+, index and MCSG1-4 crystallization suites. A partial solution was obtained via the molecular  
481 replacement method using the  $\beta$ -barrel domains from *Ec*TamA (PDB code 4C00) as search models  
482 in the P2<sub>1</sub> native crystal form, which diffracted to 2.9 Å resolution, providing the localization of the  
483 TamA  $\beta$ -barrel domain. A complete model covering the full-length sequence of *Pa*TamA<sub>25-579</sub> was  
484 ultimately built using our solution model, and the experimental phases calculated from a P2<sub>1</sub>  
485 selenomethionine-derived crystal collected at the selenium edge and diffracting to 2.6 Å resolution.  
486 This final model was used to solve all other crystal forms of *Pa*TamA using molecular replacement.  
487 After the structure was eventually solved only the TamA  $\beta$ -barrel domain was identified in the C222<sub>1</sub>  
488 crystals due to proteolytic cleavage (the C222<sub>1</sub> crystal form appeared after 4 months at 20°C). The  
489 Phenix suite and Coot<sup>46,47</sup> software were used during structure determination, refinement and building  
490 cycle. The unit cell dimensions and refinement statistics are summarized in **table 1**.

491

### 492 *Molecular dynamics simulations*

493 The amino acid sequence of TamA from *Pseudomonas aeruginosa* (residues 25-579) and coordinates  
494 were obtained from the PDB entry 8US2 chain A. The structure was validated, and hydrogens were  
495 added with MolProbity<sup>48</sup>. The position of TamA in the membranes was predicted using the PPM 2.0  
496 server<sup>49</sup>, and the POTRA-1 (residues 25-104) and POTRA-2 (residues 105-189) segments were  
497 manually placed at a distance of at least 10 Å from the membrane surface. The CHARMM-GUI  
498 Membrane Builder<sup>50,51</sup> was used to embed TamA in a POPE:POPG (80:20) bilayer, with 200 lipids  
499 per leaflet, for a total of 400 lipids and more than 50000 water molecules. All the ionizable residues

500 were considered to be in their standard protonation state at pH 7. The default N-terminal and C-  
501 terminal patches were used. The system was neutralized to an ionic concentration of 0.15 mM using  
502 NaCl. The simulations were performed with the NAMD 2.14 program<sup>52</sup> using the CHARMM36m  
503 force field<sup>53</sup> and TIP3P waters<sup>54,55</sup>. Simulations were carried out at 303.15 K under isothermal-  
504 isobaric (NPT) ensemble conditions with a 2-fs time step and periodic boundary conditions. Langevin  
505 damping with a coefficient of 1 ps<sup>-1</sup> was used to maintain constant temperature, while the pressure  
506 was controlled by a Nosé-Hoover Langevin piston at 1 atm. The length of the bonds between  
507 hydrogen and heavy atoms was constrained using SETTLE<sup>56</sup> for water molecules and SHAKE<sup>57</sup> for  
508 all other molecules. The cutoffs for short-range electrostatics and Lennard-Jones interactions were  
509 set at 12 Å, with the latter smoothed by a switching function over the range of 10 to 12 Å. Long-range  
510 electrostatic interactions were calculated with the Particle Mesh Ewald (PME) method<sup>58,59</sup> using a  
511 sixth-order interpolation and a grid spacing of  $\approx 1$  Å at each integration step. The nonbonded pair  
512 lists were updated every ten steps, and the coordinates were saved every 10 ps for analysis. Three 1-  
513  $\mu$ s trajectories were produced, and the last 300 ns of each trajectory were used for analysis. The  
514 coordinates were saved every 10 ps for analysis. The relative contact times between the POTRA-123  
515 residues and the lipid polar heads, and between the POTRA-123 residues and the lipid aliphatic  
516 chains, were considered. The relative time of contact was defined as the fraction of frames of the  
517 trajectories in which a contact between any heavy atom from a residue of POTRA-123 was within a  
518 distance of 4 Å of at least one heavy atom of one of the chemical groups of lipids. The lipid polar  
519 head atoms were defined as any heavy atoms of the phosphatidylglycerol or  
520 phosphatidylethanolamine groups of the POPG or POPE lipids, respectively. Atoms of the lipid  
521 aliphatic chains comprised carbons from the second position of the acyl chain and beyond. Distances  
522 were calculated using WORDOM software<sup>60</sup>.

523

524 ***Preparation and analysis of fluorescently labeled liposomes***

525 *E. coli* polar lipid extracts and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cyanine 5) (Cy5-  
526 PE C18:1) lipids were purchased from Avanti Polar Lipids. Lipids in powder form were dissolved in  
527 chloroform at 20 mg/mL and stored at -20°C until use. Liposomes were formed from a total of 0.5  
528 mmol of lipids composed of 97.5% *E. coli* polar lipid extracts and 2.5% Cy5-PE (C18:1) prepared in  
529 a glass tube. A uniform lipid film was created by evaporating the chloroform solution under a stream  
530 of nitrogen gas. After drying in a vacuum desiccator overnight, the lipid film was resuspended in 20  
531 mM HEPES (pH 8) and 0.2 M NaCl to a final concentration of 0.5 mM. The lipid suspension was  
532 extruded 12 times through a 0.1 µm polycarbonate membrane to generate calibrated unilamellar  
533 vesicles of 100 nm. Liposomes were freshly prepared prior to each MST experiment. The size,  
534 homogeneity, and concentration of the lipidic vesicles were determined using a nanoparticle tracking  
535 analyzer. Analyses were performed with a Nanosight NS3000 (Malvern) at a 1:2000 dilution in 20  
536 mM HEPES (pH 8), 0.2 M NaCl and 0.05% Tween-20, yielding 40-80 particles/frame. The samples  
537 were injected according to the following setting: camera level: 15, data collection: 3x60 sec, flow  
538 rate: 75 µL.min<sup>-1</sup>, analysis setting: 6-8. The data were recorded in triplicate, and the videos were  
539 analyzed with nanoparticle tracking analysis (NTA) 2.0 software.

540

541 ***Microscale thermophoresis (MST) assay***

542 POTRA-123 and mut-POTRA-123 were prepared at 320 µM, and POTRA-23 and POTRA-1 were  
543 prepared at 80 µM. From these stock solutions, twofold serial dilutions were carried out to generate  
544 sixteen samples. The labeled liposomes were diluted 200-fold in 20 mM HEPES (pH 8), 0.2 M NaCl  
545 and 0.01% tween 20 to a final lipid concentration of 2 µM. Following dilution, the liposomes were

546 immediately mixed in equal volumes with the sixteen protein samples. The protein/liposome mixtures  
547 were loaded in capillaries to titrate the binding association between fluorescently labeled lipid  
548 vesicles and POTRA domains using a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper, Germany). All the  
549 experiments were performed in triplicate using 2% MST power and laser on/off times of 20/5 s.  
550 Binding titration analyses were carried out using NanoTemper analysis software, and the dissociation  
551 constants were calculated using a simple 1-to-1 binding model according to the law of mass action<sup>61</sup>.

552

### 553 *Protein adsorption measurements in monolayers*

554 The surface pressure ( $\pi$ ) was measured with a DeltaPi4 microtensiometer (Kibron Inc., Helsinki,  
555 Finland) using the Wilhelmy method in a 1000  $\mu$ L Teflon trough (diameter: 18 mm, depth: 5 mm). A  
556 Plexiglass box was used to regulate humidity during the experiments, and the temperature was  
557 maintained at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . The subphase in the trough consisted of 1000  $\mu$ L buffer of 500 mM potassium  
558 phosphate monobasic buffer, 200 mM Tris-base and 100 mM sodium chloride at pH 7.0. The  
559 saturating concentrations of the POTRA domain constructs were determined by injecting increasing  
560 volumes underneath the subphase surface, and the concentrations were found to be 121  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for  
561 POTRA-1, 202  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for POTRA-23, 322  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for POTRA-123 and 27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for mut-POTRA-  
562 123 for respective surface pressure values of 11 mN/m, 23 mN/m, 20 mN/m and 22 mN/m, which  
563 corresponded to the onset of monolayer saturation and were used for all subsequent experiments with  
564 the corresponding constructions. To conduct the experiments, a few microliters of the phospholipid  
565 solution was spread onto the subphase to achieve the desired initial surface pressure ( $\pi_i$ ). The film  
566 was then left until the spreading solvent evaporated completely and the film reached equilibrium; the  
567 time required depended on the lipid type, the spreading volume, and the initial surface pressure. The  
568 POTRA-1, POTRA-23, POTRA-123 and mut-POTRA-123 constructs were subsequently injected

569 beneath the lipid monolayer at their respective saturating concentrations (see above), and the  
570 interaction between the four POTRA domain constructions and the phospholipid monolayer was  
571 monitored during the experiment with surface pressure kinetics until the equilibrium surface pressure  
572 ( $\pi_e$ ) was reached. The binding parameters were calculated following a previously described method,  
573 and the uncertainties were determined accordingly. To summarize, the change in surface pressure ( $\Delta\pi$   
574 =  $\pi_e - \pi_i$ ) resulting from protein injection was plotted as a function of the initial surface pressure ( $\pi_i$ ),  
575 and a linear regression was fitted to the data. The maximum insertion pressure (MIP) was determined  
576 at the intersection of the plot with the x-axis, and the synergy was calculated by adding 1 to the slope.  
577 The uncertainty of the MIP was calculated from the covariance of the experimental data on the linear  
578 regression, while the uncertainty of the synergy was calculated using the formula  $[\sigma(\pi_e) (1 - r^2)^{1/2}]$   
579 /  $[\sigma(\pi_i) (n - 2)^{1/2}]$ , where  $\sigma$  denotes the standard deviation,  $r$  denotes the correlation coefficient, and  
580  $n$  denotes the number of data points. The calculations of the binding parameters and their uncertainties  
581 were performed using an online software calculator, which can be accessed at  
582 <http://www.crchudequebec.ulaval.ca/BindingParametersCalculator/>.

583

#### 584 ***Protein stability assay by differential scanning fluorescence***

585 Differential scanning fluorescence (DSF) was performed to assess protein stability by monitoring the  
586 thermal unfolding of the POTRA domains using the Protein Thermal Shift™Dye (Applied  
587 Biosystems™) as a probe. Briefly, 0.5 mg/mL of POTRA constructs were incubated with 1X SYPRO  
588 orange dye at a final concentration of 20 mM HEPES (pH 8), 200 mM NaCl, 2% DMSO. The mixture  
589 was then immediately distributed into a 96-well microplate and heated from 25°C to 99°C at a rate of  
590 0.05°C/second using a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems™). The  
591 fluorescence intensity was recorded using a ROX emission filter (645nm), and melting curves were

592 generated using StepOne Software by plotting the negative first-derivative normalized fluorescence  
593 as a function of the temperature.

594

#### 595 ***Determination of the lipid phase transition temperature by generalized polarization***

596 Liposomes (0.2 mM of DMPG) were prepared as described above and incubated at room temperature  
597 for one hour with 8  $\mu$ M Laurdan fluorescence probe in a solution containing 20 mM HEPES, 200  
598 mM NaCl at pH 8, and 0.25% DMSO. Subsequently, POTRA constructs were added (or not) at a  
599 lipid/protein ratio of 1/400, and the mixture was heated from 8°C to 42°C using a Cary Eclipse  
600 Fluorescence Spectrometer (Agilent). The fluorescence emission intensity was recorded as the  
601 temperature increased at two wavelengths, 450 nm and 490 nm, with the excitation wavelength set at  
602 360 nm. The generalized polarization (GP) was calculated as  $GP = ((I_{450nm} - I_{490nm}) / (I_{450nm} + I_{490nm}))$   
603 and plotted against temperature<sup>39</sup>; the transition temperature of the lipid vesicle membrane was  
604 determined from the first derivative. All the experiments were performed in triplicate.

605

#### 606 **CONFLICT OF INTEREST**

607 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
608 relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

609

#### 610 **ACKNOWLEDGMENTS**

611 The authors thank Jihane Ati (INRS), who contributed to the early phase of this study, and intern  
612 Marta Zdanovska (INRS), who provided technical assistance. This work was supported by the Natural  
613 Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant RGPIN-2017-  
614 06091 and RGPIN-2022-03958 as well as the PROTEO new collaborative initiatives program and

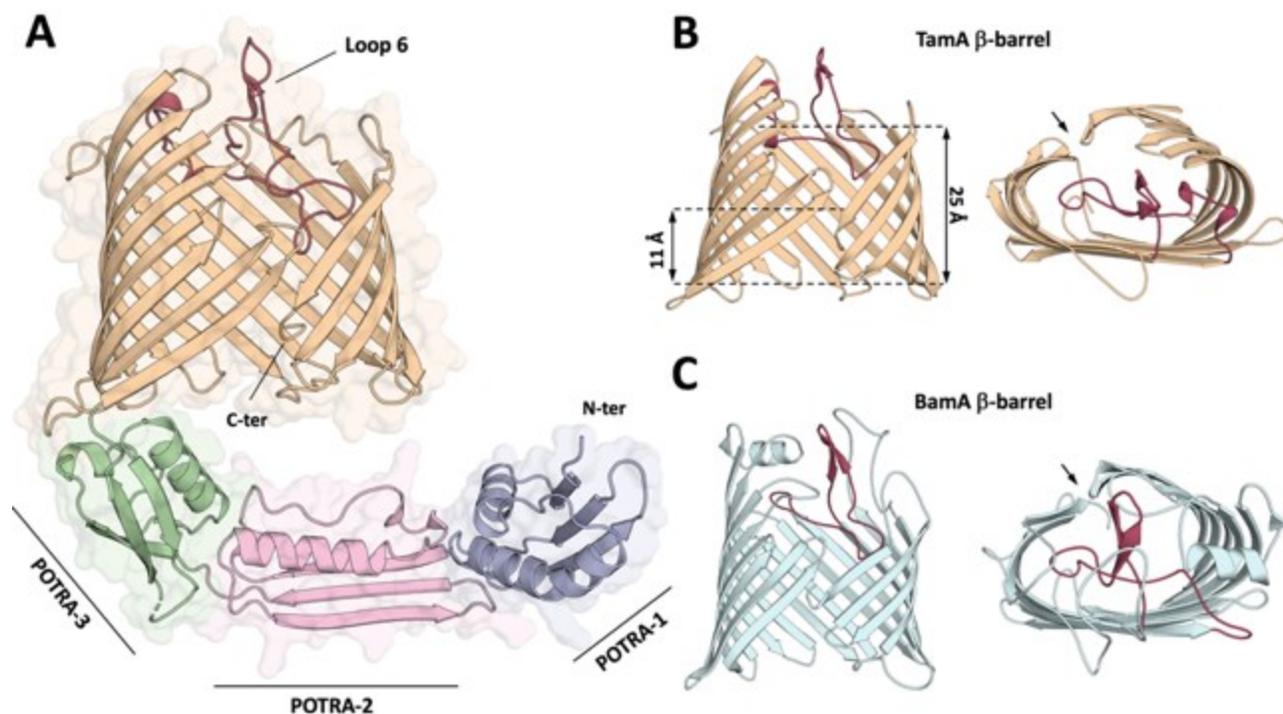
615 FRQNT research support for new academics grant 2019-NC-253753. This research used synchrotron  
616 resources from the Canadian Light Source at Beamline 08ID-1, which is supported by the Canada  
617 Foundation for Innovation, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and  
618 Canadian Institutes of Health Research. The authors appreciate Compute Canada's support for the  
619 HPC platform, without which current MD simulations would not have been possible. E. Boisselier is  
620 a Junior 2 Research Scholar from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). The funders had  
621 no role in the study design, data collection or interpretation, or the decision to submit the work for  
622 publication.

623

## 624 **CONTRIBUTIONS**

625 A.M. and C.C. designed the study. A.M., P.L.J., L.J.R., M.L., C.M., M.E.B. performed the  
626 experiments. A.M., P.L.J., T.F.M., M.E.B., P.L., E.B., and C.C. analyzed the data. A.M. and C.C.  
627 wrote the manuscript with inputs of all authors.

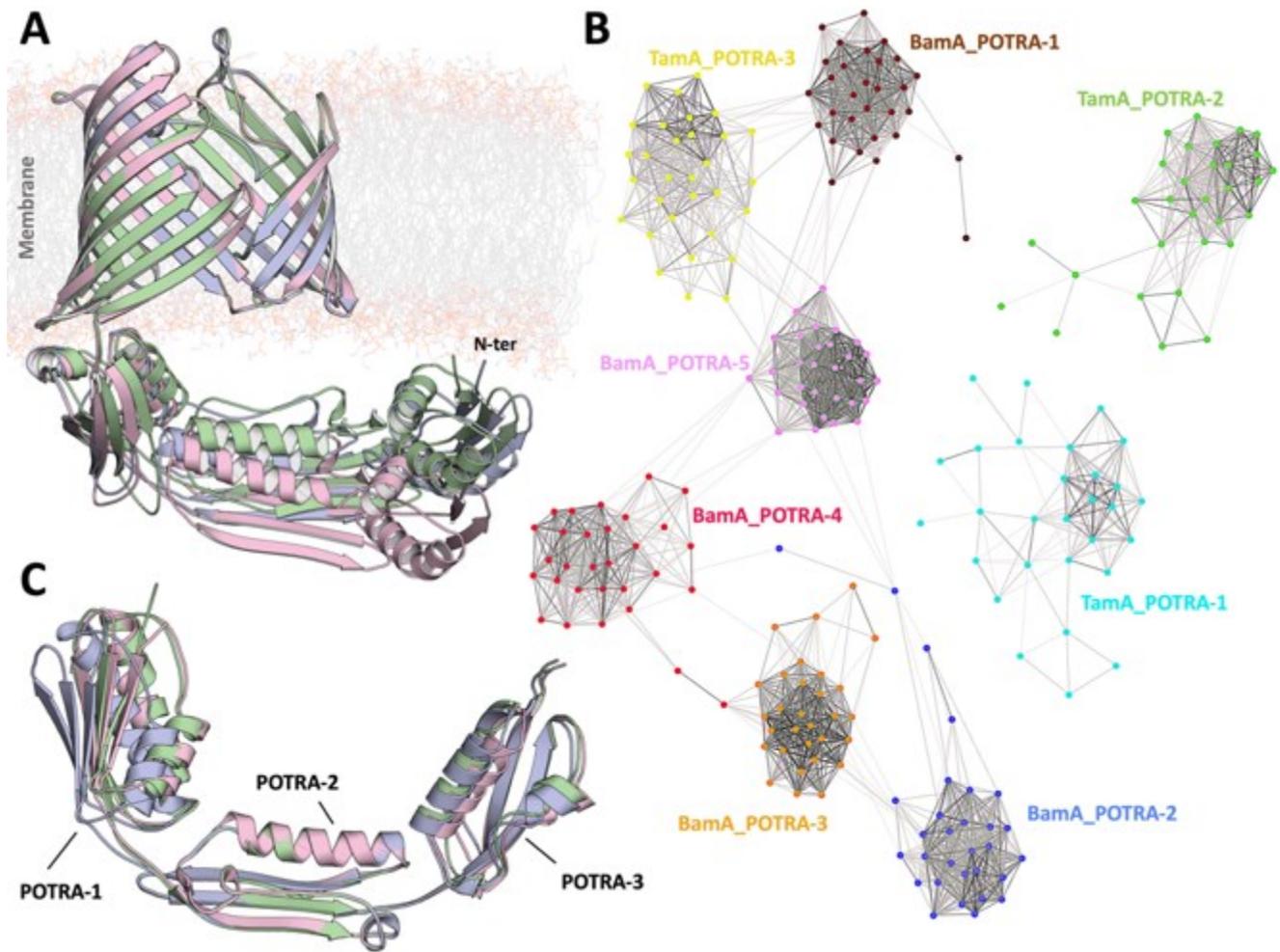
628



629

630

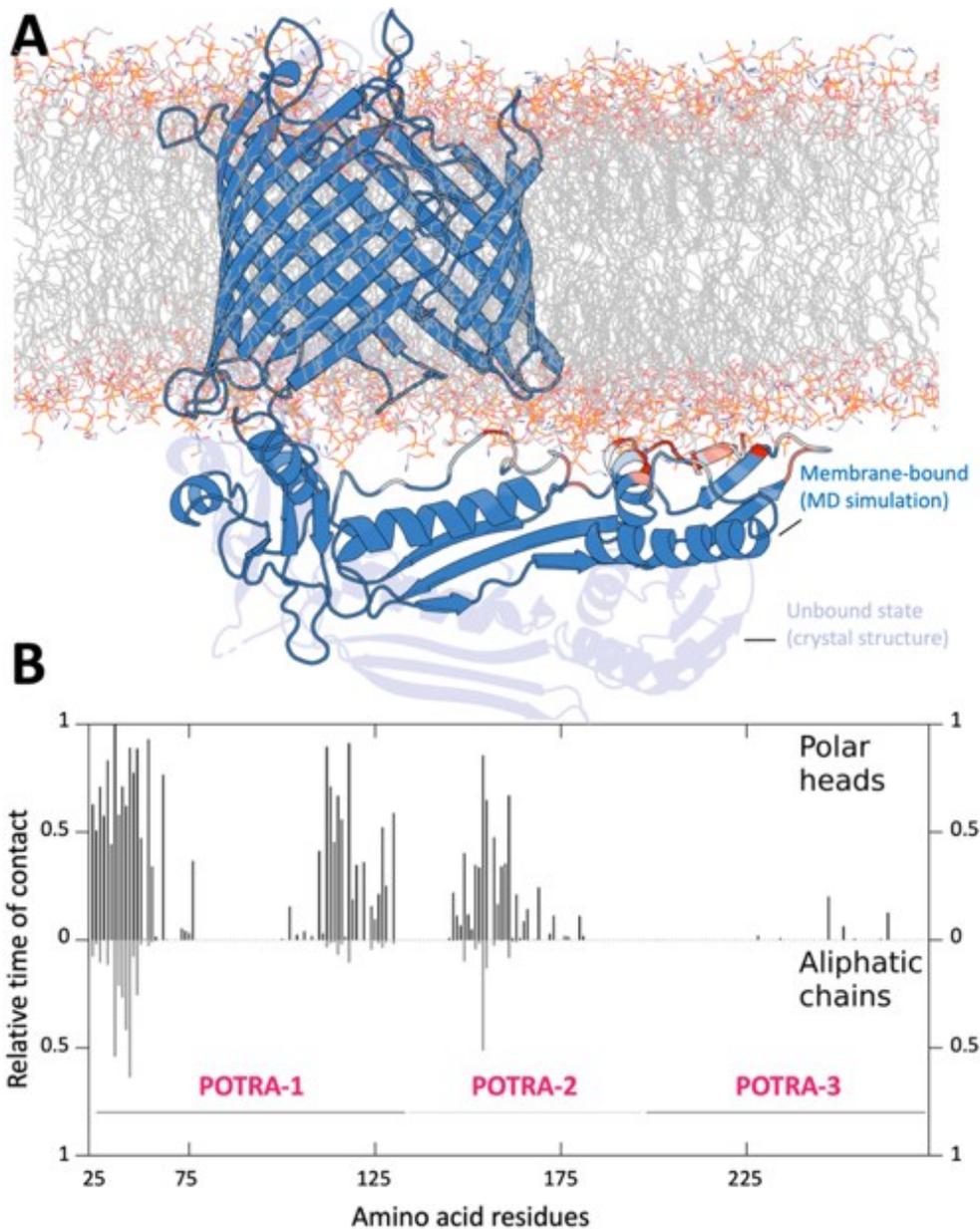
631 **Figure 1: TamA has a conserved fold with the OMP-insertase BamA.** (A) Structure of full-length  
632 *PaTamA* in cartoon representation. The outer membrane domain is visualized in beige, and the three  
633 periplasmic polypeptide-transport-associated (POTRA) domains 1, 2 and 3 are colored blue, pink,  
634 and green, respectively. (B) and (C) represent side and top views of the membrane domains and lateral  
635 gates of *PaTamA* and *EcBamA* in similar orientations. The black arrows indicate the unzipped  
636 junction forming the lateral gate between strands 1 and 16.



637

638

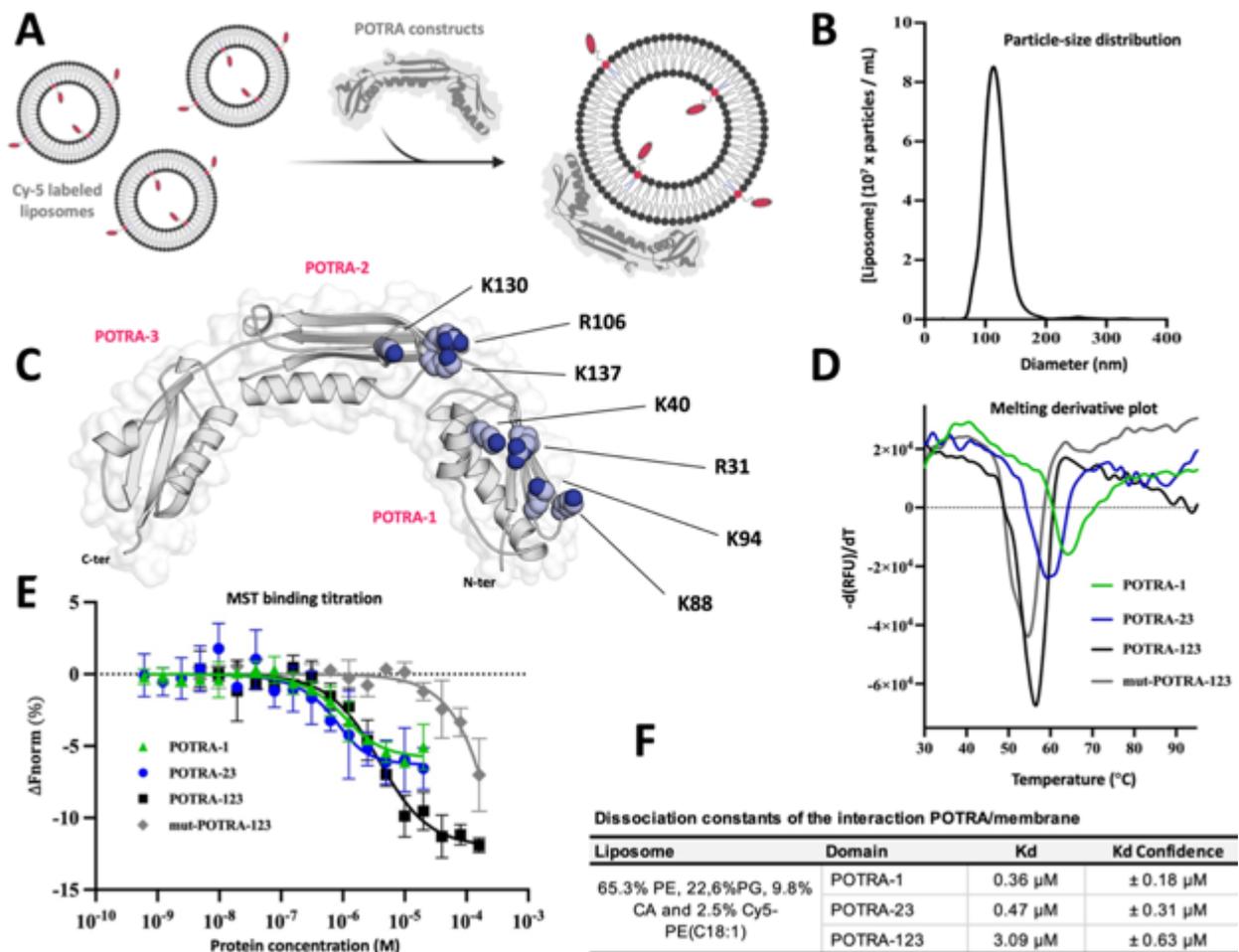
639 **Figure 2: POTRA domains of TamA are flexible and differ from BamA sequences.** (A) Structural  
 640 overlay of the 3 *PaTamA* structures solved in this study from 3 different space groups. The structures  
 641 are aligned on their membrane domains to illustrate the flexibility of the periplasmic POTRA domains  
 642 relative to the membrane-embedded  $\beta$ -domain. (B) The CLANS analysis depicts an all-against-all  
 643 pairwise BLAST clustering of individual POTRA sequences of BamA and TamA/TamL from 30  
 644 representatives of alpha- beta- gamma- delta-Proteobacteria and Bacteroidetes that encode the BAM  
 645 and TAM machineries (protein sequences listed in sup. table 2). Line connections are drawn between  
 646 similar sequences based on a P value cutoff of  $1e^{-5}$ . (C) The POTRA domains solved from the P2<sub>1</sub>,  
 647 C2 and P22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> space groups (colored as in panel A) are aligned on their corresponding POTRA-2  
 648 domains to illustrate the intrinsic flexible orientation within the POTRA arms.



649

650

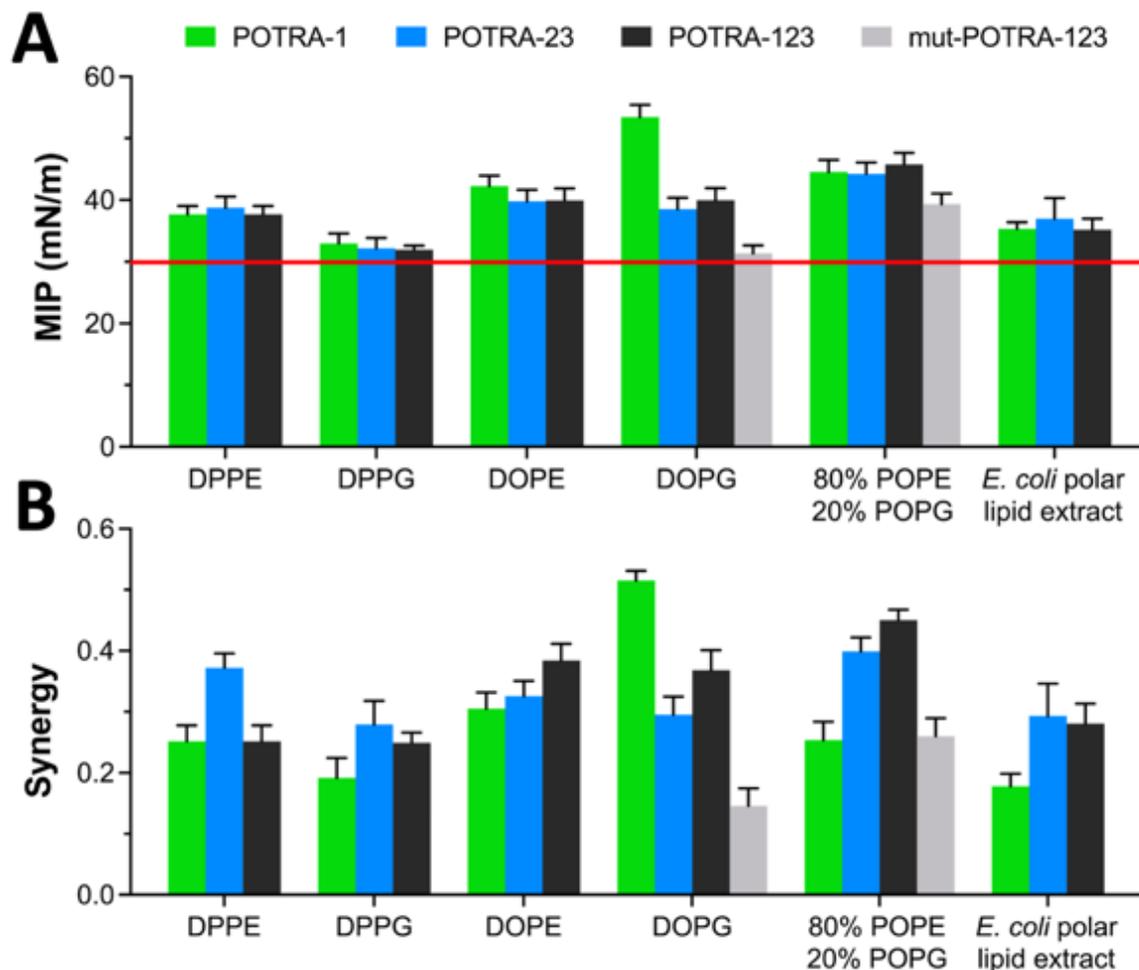
651 **Figure 3: POTRA domains of TamA associate with POPE:POPG membranes in MD**  
 652 **simulations.** (A) TamA is represented as a cartoon, and the lipids are drawn as sticks (gray for the  
 653 aliphatic chains and colors for the polar heads). The amino acids from the POTRA domains are  
 654 colored according to their relative contact time with the lipid polar heads, from blue (no contact) to  
 655 red (higher times of contact). (B) Relative contact times between POTRA-123 residues and lipid polar  
 656 heads (top) and aliphatic chains (bottom). Lipids located within 4 Å of the protein residues were used  
 657 for the calculations. The POTRA segments are identified along the residue sequence.



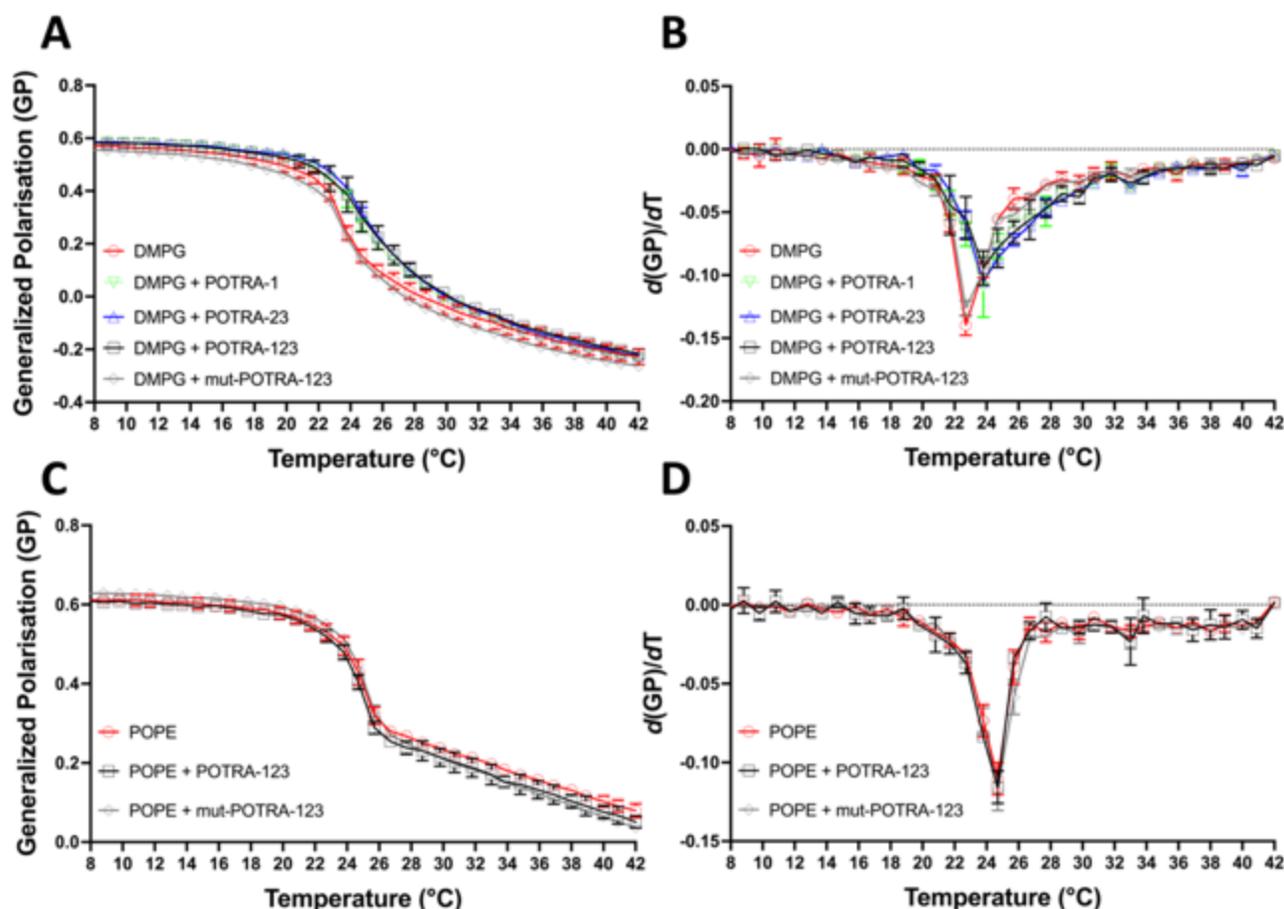
658  
659

660 **Figure 4: POTRA domains of TamA bind to liposomes via a series of polar amino acids. (A)**  
 661 Cy5-labeled liposomes composed of 97.5% *E. coli* polar lipid extract (67%  
 662 phosphatidylethanolamine, 23.3% phosphatidylglycerol, 9.7% cardiolipin) and 2.5% Cy5-PE(C18:1)  
 663 phospholipids were used as a membrane model to study POTRA/membrane interactions. The  
 664 liposomes were titrated with increasing concentrations of POTRA domains (mut-POTRA-123,  
 665 POTRA-123, POTRA-23 and POTRA-1), and the dissociation constants were measured by  
 666 microscale thermophoresis (MST). **(B)** Size distribution of the Cy5-labeled liposomes as determined  
 667 with a particle tracking analyzer to confirm the homogeneity of the liposome samples. **(C)** Visual  
 668 depiction of mutated amino acid positions at the predicted membrane interface. The POTRA arm is  
 669 drawn in cartoon representation, while the side chains of the mutated residues are shown as spheres.  
 670 **(D)** Derivative melt curve plots illustrating the thermostability of the POTRA-1, POTRA-23,  
 671 POTRA-123 and mut-POTRA-123 domains as determined by differential scanning fluorescence; the

672 calculated melting temperatures are 64, 61, 55, and 53°C, respectively. (E) Dose-response curves for  
 673 the binding interactions between Cy5-labeled liposomes and the POTRA-1 (green), POTRA-23  
 674 (blue), POTRA-123 (black) and mut-POTRA-123 (grey). The estimated  $K_d$  values are shown in panel  
 675 (F).  
 676  
 677

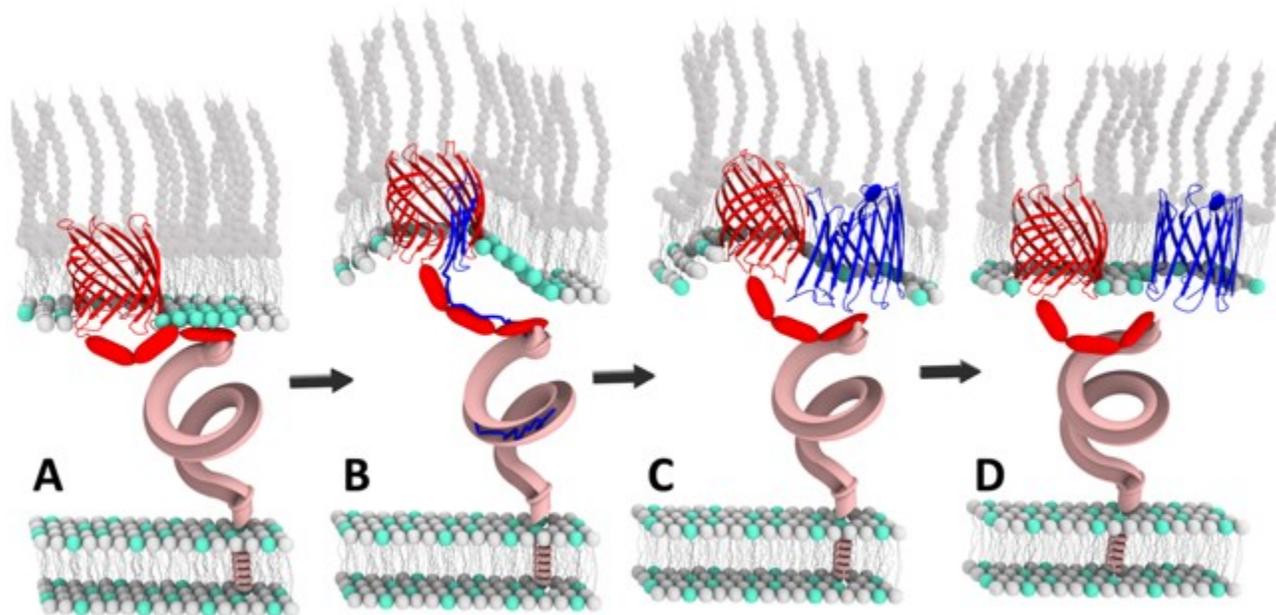


678  
 679 **Figure 5: POTRA-1 preferentially interacts with unsaturated phosphatidylglycerol lipids.**  
 680 Histogram plot showing the maximum insertion pressure (MIP) values (A) and synergy values (B) of  
 681 POTRA-1, POTRA-23, POTRA-123 and mut-POTRA-123 for 6 phospholipids composed of DPPE  
 682 (diC16:0 PE), DPPG (diC16:0 PG), DOPE (diC18:1 PE), DOPG (diC18:1 PG), POPE (C16:0 C18:1  
 683 PE), POPG (C16:0 C18:1 PG), and *E. coli* polar lipid extract. An MIP value below 30mN/m  
 684 (representing the physiological membrane pressure) indicates a lack of interaction with the  
 685 monolayer.



686

687 **Figure 6: POTRA domains increase the phase transition temperature of DMPG lipids.** Global  
 688 phase transition temperature assessment by Laurdan fluorescence assay for DMPG and POPE vesicle  
 689 membranes, alone (red) or in the presence of POTRA-1 (green), POTRA-23 (blue), POTRA-123  
 690 (black) or mut-POTRA-123 (grey). **(A)** Generalized polarization (GP) values as a function of  
 691 temperature in DMPG membranes. **(B)** First derivative of the GP curves illustrating the phase  
 692 transition temperature ( $T_m$ ) of DMPG membranes at the peak values. The calculated  $T_m$  values are  
 693 23°C for liposomes alone or with mut-POTRA-123, and 24°C for liposomes with POTRA-1,  
 694 POTRA-23 and POTRA-123. **(C)** Generalized polarization (GP) values as a function of temperature  
 695 for the POPE membranes. **(D)** First derivative of the GP curves illustrating the phase transition  
 696 temperature ( $T_m$ ) of POPE liposomes at the peak values. The calculated  $T_m$  values are 24°C for  
 697 liposomes alone or in the presence of POTRA-123 or mut-POTRA-123.



698

699 **Figure 7: Refined functional model of the TAM machinery.** (A) The TAM machinery is composed  
700 of the inner membrane protein TamB (pink) and TamA (red), which act as a periplasmic ladder and  
701 an OMP insertase, respectively<sup>7,62</sup>. The TAM is held<sup>7</sup> together through interactions between the  
702 carboxy terminus of TamB and the POTRA-1 domain of TamA. In its resting conformation, the  
703 POTRA arm associates with the outer membrane, participating in the local accumulation of PG lipids  
704 (green spheres) in the nearby environment of the lateral gate. The local distribution of negative  
705 charges across the membrane (LPS in the outer leaflet and PG in the inner leaflet) positively  
706 influences OMP folding<sup>34,35,40</sup>. The membrane-bound POTRA domains also contribute to steric  
707 interactions with existing OMP, ensuring lipid accessibility for the insertion of nascent proteins<sup>25</sup>. (B)  
708 TamB functions as a delivery conduit to transport nascent OMPs and glycerophospholipids across  
709 the periplasm and peptidoglycan layer (not represented to simplify the model)<sup>42,43,62</sup>. The interaction  
710 with the OMP substrate (blue) triggers conformational changes within TamA, characterized by the  
711 opening of the lateral gate<sup>18</sup> and the vertical displacement of the POTRA arm away from the outer  
712 membrane<sup>26</sup>. This structural transition results in local outer membrane distortion and lipid  
713 perturbation, in favor of OMP assembly. (C) Within the lateral gate of TamA, strand  $\beta$ 1 acts as a  
714 seeding template mediating the binding of the C-terminal  $\beta$ -strand motif of the substrate, assembling  
715 the nascent OMP by sequential  $\beta$ -augmentation, proceeding from the C-terminus to the N-terminus,  
716 generating a hybrid barrel<sup>41</sup>. (D) This process continues until the fully assembled OMP is eventually

717 released, a step that could be potentially facilitated by the reassociation of the POTRA domains with  
718 the outer membrane, fostering steric interaction with the newly assembled OMP.

719 **Table 1:** Data collection and refinement statistics for the *Pseudomonas aeruginosa* TamA crystal  
 720 structures solved in this study.

	TamA (Se-Met derivative)	TamA ( $\beta$ -barrel) (Platinate-derivative)	TamA (Native)	TamA (Native)
<b>PDB code</b>	8US1	8US4	8US3	8US2
<b>Phasing Method</b>	Se-SAD	MR	MR	MR
<b>Data collection*</b>				
Space group	P2 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>	C2	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions:				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	78.7, 63.8, 84.0	97.9, 149.8, 53.6	140.4, 63.9, 81.4	73.0, 155.5, 157.0
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 108.5, 90	90, 90, 90	90, 99.4, 90	90, 90, 90
Solvent content (%)	61.4	56.7	54.3	65.3
Wavelength (Å)	0.97910	1.06880	0.97949	0.97918
Resolution (Å)	40.9-2.65 (2.70-2.65)	49.0-3.15 (3.26-3.15)	48.6-3.1 (3.21-3.1)	44.1-3.95 (4.09-3.95)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	16.1 (1.25)	9.2 (3.4)	11.2 (1.6)	7.2 (1.7)
Completeness (%)	93.2 (83.4)	96.8 (96.4)	100 (100)	100 (100)
Redundancy	4.1 (2.8)	1.9 (1.9)	2.0 (2.0)	4.0 (4.1)
R <sub>sym</sub>	0.11 (1.57)	0.12 (0.44)	0.04 (0.48)	0.35 (1.18)
<b>Refinement*</b>				
Resolution (Å)	40.9 - 2.65	49.0 - 3.15	48.6 - 3.1	44.1 - 3.95
No. reflections	22512 (1620)	6925 (668)	13130 (1327)	16299 (1597)
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.20/0.26	0.30/0.35	0.25/0.30	0.30/0.38
<b>No. atoms</b>	4458	2434	4343	8016
Protein	4303	2389	4303	8016
Ligands	84	45	22	0
Water	71	0	18	0
<b>B-factors</b>				
Protein	49.7	89.4	104.4	159.8
Ligands	70.1	89.4	50.3	
Water	43.9		47.3	
<b>R.m.s deviations</b>				
Bond lengths (Å)	0.007	0.008	0.007	0.004
Bond angles (°)	1.17	1.57	1.42	1.40
<b>Ramachandran</b>				
Favored (%)	96.0	95.0	95.0	95.0
Outlier (%)	0.2	0.3	0.4	0.3

721 \*The shell with the highest resolution is shown in parentheses

## 722 References

- 723 1. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et*  
724 *Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).
- 725 2. Lehman, K. M. & Grabowicz, M. Countering Gram-Negative Antibiotic Resistance: Recent  
726 Progress in Disrupting the Outer Membrane with Novel Therapeutics. *Antibiotics* **8**, 163 (2019).
- 727 3. Jung, H.-J., Sorbara, M. T. & Pamer, E. G. TAM mediates adaptation of carbapenem-  
728 resistant *Klebsiella pneumoniae* to antimicrobial stress during host colonization and infection. *PLoS*  
729 *Pathog* **17**, e1009309 (2021).
- 730 4. Schulz, G. E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica*  
731 *Acta (BBA) - Biomembranes* **1565**, 308–317 (2002).
- 732 5. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer  
733 membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**, 239–253 (2000).
- 734 6. Malinverni, J. C. & Silhavy, T. J. Assembly of Outer Membrane  $\beta$ -Barrel Proteins: the Bam  
735 Complex. *EcoSal Plus* **4**, ecosalplus.4.3.8 (2011).
- 736 7. Selkrig, J. *et al.* Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer  
737 membranes. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 506–510 (2012).
- 738 8. Stubenrauch, C. *et al.* Effective assembly of fimbriae in *Escherichia coli* depends on the  
739 translocation assembly module nanomachine. *Nat Microbiol* **1**, 16064 (2016).
- 740 9. Stubenrauch, C. J. & Lithgow, T. The TAM: A Translocation and Assembly Module of the  
741  $\beta$ -Barrel Assembly Machinery in Bacterial Outer Membranes. *EcoSal Plus* **8**, ecosalplus.ESP-0036-  
742 2018 (2019).
- 743 10. Heinz, E. *et al.* Conserved Features in the Structure, Mechanism, and Biogenesis of the  
744 Inverse Autotransporter Protein Family. *Genome Biol Evol* **8**, 1690–1705 (2016).
- 745 11. Stubenrauch, C. J., Bamert, R. S., Wang, J. & Lithgow, T. A noncanonical chaperone  
746 interacts with drug efflux pumps during their assembly into bacterial outer membranes. *PLoS Biol*  
747 **20**, e3001523 (2022).
- 748 12. Selkrig, J. *et al.* Conserved features in TamA enable interaction with TamB to drive the  
749 activity of the translocation and assembly module. *Sci Rep* **5**, 12905 (2015).
- 750 13. Li, M., Jia, B., Sun, Y. & Sun, L. The Translocation and Assembly Module (TAM) of  
751 *Edwardsiella tarda* Is Essential for Stress Resistance and Host Infection. *Front. Microbiol.* **11**, 1743  
752 (2020).
- 753 14. Albrecht, R. *et al.* Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein  
754 biogenesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 1779–1789 (2014).
- 755 15. Gruss, F. *et al.* The structural basis of autotransporter translocation by TamA. *Nat Struct*  
756 *Mol Biol* **20**, 1318–1320 (2013).
- 757 16. Noinaj, N., Kuszak, A. J., Balusek, C., Gumbart, J. C. & Buchanan, S. K. Lateral Opening  
758 and Exit Pore Formation Are Required for BamA Function. *Structure* **22**, 1055–1062 (2014).
- 759 17. Bamert, R. S. *et al.* Structural basis for substrate selection by the translocation and assembly  
760 module of the  $\beta$ -barrel assembly machinery. *Molecular Microbiology* **106**, 142–156 (2017).
- 761 18. Liu, J. & Gumbart, J. C. Membrane thinning and lateral gating are consistent features of  
762 BamA across multiple species. *PLoS Comput Biol* **16**, e1008355 (2020).
- 763 19. Doyle, M. T. & Bernstein, H. D. BamA forms a translocation channel for polypeptide export  
764 across the bacterial outer membrane. *Molecular Cell* **81**, 2000-2012.e3 (2021).
- 765 20. Heinz, E., Selkrig, J., Belousoff, M. J. & Lithgow, T. Evolution of the Translocation and  
766 Assembly Module (TAM). *Genome Biology and Evolution* **7**, 1628–1643 (2015).
- 767 21. Calmettes, C., Judd, A. & Moraes, T. F. Structural Aspects of Bacterial Outer Membrane

768 Protein Assembly. *Adv Exp Med Biol* **883**, 255–270 (2015).

769 22. Gu, Y. *et al.* Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex.  
770 *Nature* **531**, 64–69 (2016).

771 23. White, P. *et al.* The role of membrane destabilisation and protein dynamics in BAM  
772 catalysed OMP folding. *Nat Commun* **12**, 4174 (2021).

773 24. Horne, J. E., Brockwell, D. J. & Radford, S. E. Role of the lipid bilayer in outer membrane  
774 protein folding in Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* **295**, 10340–10367 (2020).

775 25. Webby, M. N. *et al.* Lipids mediate supramolecular outer membrane protein assembly in  
776 bacteria. *Sci Adv* **8**, eadc9566 (2022).

777 26. Shen, H.-H. *et al.* Reconstitution of a nanomachine driving the assembly of proteins into  
778 bacterial outer membranes. *Nat Commun* **5**, 5078 (2014).

779 27. Frickey, T. & Lupas, A. CLANS: a Java application for visualizing protein families based  
780 on pairwise similarity. *Bioinformatics* **20**, 3702–3704 (2004).

781 28. Feng, S. Interpretation of Mechanochemical Properties of Lipid Bilayer Vesicles from the  
782 Equation of State or Pressure–Area Measurement of the Monolayer at the Air–Water or Oil–Water  
783 Interface. *Langmuir* **15**, 998–1010 (1999).

784 29. MacDonald, R. C. & Simon, S. A. Lipid monolayer states and their relationships to bilayers.  
785 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4089–4093 (1987).

786 30. Boisselier, É., Demers, É., Cantin, L. & Salesse, C. How to gather useful and valuable  
787 information from protein binding measurements using Langmuir lipid monolayers. *Advances in*  
788 *Colloid and Interface Science* **243**, 60–76 (2017).

789 31. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and  
790 pathways. *FEMS Microbiology Reviews* **40**, 133–159 (2016).

791 32. Calvez, P., Demers, É., Boisselier, É. & Salesse, C. Analysis of the Contribution of  
792 Saturated and Polyunsaturated Phospholipid Monolayers to the Binding of Proteins. *Langmuir* **27**,  
793 1373–1379 (2011).

794 33. Morein, S., Andersson, A., Rilfors, L. & Lindblom, G. Wild-type Escherichia coli cells  
795 regulate the membrane lipid composition in a ‘window’ between gel and non-lamellar structures. *J*  
796 *Biol Chem* **271**, 6801–6809 (1996).

797 34. Patel, G. J., Behrens-Kneip, S., Holst, O. & Kleinschmidt, J. H. The Periplasmic Chaperone  
798 Skp Facilitates Targeting, Insertion, and Folding of OmpA into Lipid Membranes with a Negative  
799 Membrane Surface Potential. *Biochemistry* **48**, 10235–10245 (2009).

800 35. Gessmann, D. *et al.* Outer membrane  $\beta$ -barrel protein folding is physically controlled by  
801 periplasmic lipid head groups and BamA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5878–5883 (2014).

802 36. Heimburg, T., Angerstein, B. & Marsh, D. Binding of peripheral proteins to mixed lipid  
803 membranes: effect of lipid demixing upon binding. *Biophys J* **76**, 2575–2586 (1999).

804 37. Vats, K., Knutson, K., Hinderliter, A. & Sheets, E. D. Peripheral protein organization and its  
805 influence on lipid diffusion in biomimetic membranes. *ACS Chem Biol* **5**, 393–403 (2010).

806 38. Lin, Y.-C., Chipot, C. & Scheuring, S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing  
807 lipid phase transition. *Nat Commun* **11**, 230 (2020).

808 39. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M. & Gratton, E. Quantitation of lipid  
809 phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J*  
810 **60**, 179–189 (1991).

811 40. Machin, J. M., Kalli, A. C., Ranson, N. A. & Radford, S. E. Protein–lipid charge  
812 interactions control the folding of outer membrane proteins into asymmetric membranes. *Nat.*  
813 *Chem.* (2023) doi:10.1038/s41557-023-01319-6.

- 814 41. Shen, C. *et al.* Structural basis of BAM-mediated outer membrane  $\beta$ -barrel protein  
815 assembly. *Nature* **617**, 185–193 (2023).
- 816 42. Douglass, M. V., McLean, A. B. & Trent, M. S. Absence of YhdP, TamB, and YdbH leads  
817 to defects in glycerophospholipid transport and cell morphology in Gram-negative bacteria. *PLoS*  
818 *Genet* **18**, e1010096 (2022).
- 819 43. Ruiz, N., Davis, R. M. & Kumar, S. YhdP, TamB, and YdbH Are Redundant but Essential  
820 for Growth and Lipid Homeostasis of the Gram-Negative Outer Membrane. *mBio* **12**, e02714-21  
821 (2021).
- 822 44. van den Ent, F. & Löwe, J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes  
823 into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **67**, 67–74 (2006).
- 824 45. Laible, M. & Boonrod, K. Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids. *JoVE*  
825 1135 (2009) doi:10.3791/1135.
- 826 46. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular  
827 structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213–221 (2010).
- 828 47. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta*  
829 *Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126–2132 (2004).
- 830 48. Williams, C. J. *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom  
831 structure validation. *Protein Sci* **27**, 293–315 (2018).
- 832 49. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. & Lomize, A. L. OPM database  
833 and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res* **40**,  
834 D370-376 (2012).
- 835 50. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface  
836 for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2008).
- 837 51. Jo, S., Kim, T. & Im, W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes  
838 for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE* **2**, e880 (2007).
- 839 52. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with  
840 NAMD. *The Journal of Chemical Physics* **153**, 044130 (2020).
- 841 53. Huang, J. *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically  
842 disordered proteins. *Nat Methods* **14**, 71–73 (2017).
- 843 54. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L.  
844 Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical*  
845 *Physics* **79**, 926–935 (1983).
- 846 55. Durell, S. R., Brooks, B. R. & Ben-Naim, A. Solvent-Induced Forces between Two  
847 Hydrophilic Groups. *J. Phys. Chem.* **98**, 2198–2202 (1994).
- 848 56. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE  
849 algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **13**, 952–962 (1992).
- 850 57. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian  
851 equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of*  
852 *Computational Physics* **23**, 327–341 (1977).
- 853 58. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald  
854 sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **98**, 10089–10092 (1993).
- 855 59. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*  
856 **103**, 8577–8593 (1995).
- 857 60. Seeber, M. *et al.* Wordom: A user-friendly program for the analysis of molecular structures,  
858 trajectories, and free energy surfaces. *J. Comput. Chem.* **32**, 1183–1194 (2011).
- 859 61. Seidel, S. A. I. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under

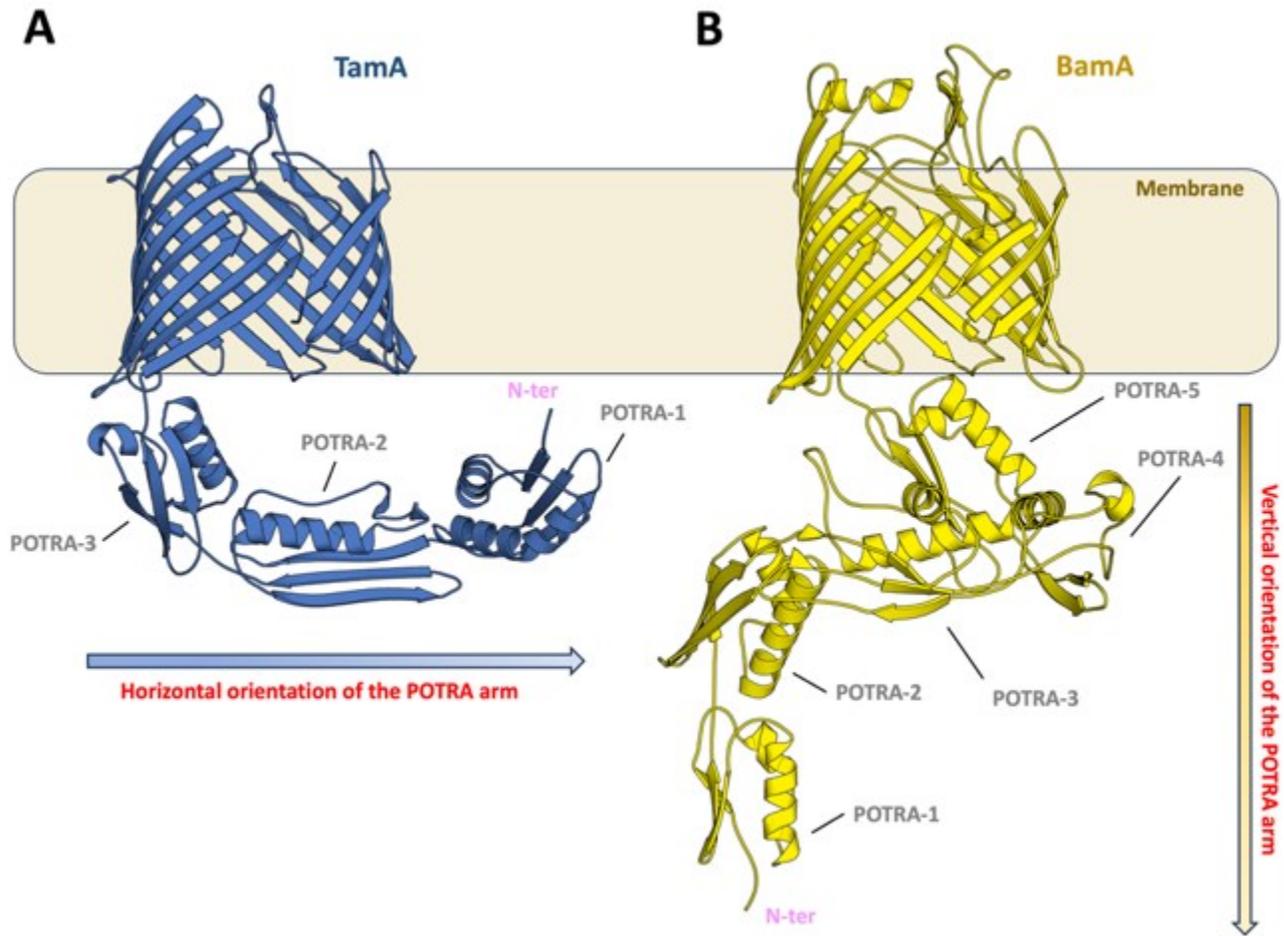
860 previously challenging conditions. *Methods* **59**, 301–315 (2013).  
861 62. Josts, I. *et al.* The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic  $\beta$   
862 Taco Fold. *Structure* **25**, 1898-1906.e5 (2017).  
863

864 Supplementary information for

865  
866  
867  
868  
869  
870  
871 **POTRA domains of the TamA insertase interact with the outer**  
872 **membrane and modulate membrane properties.**

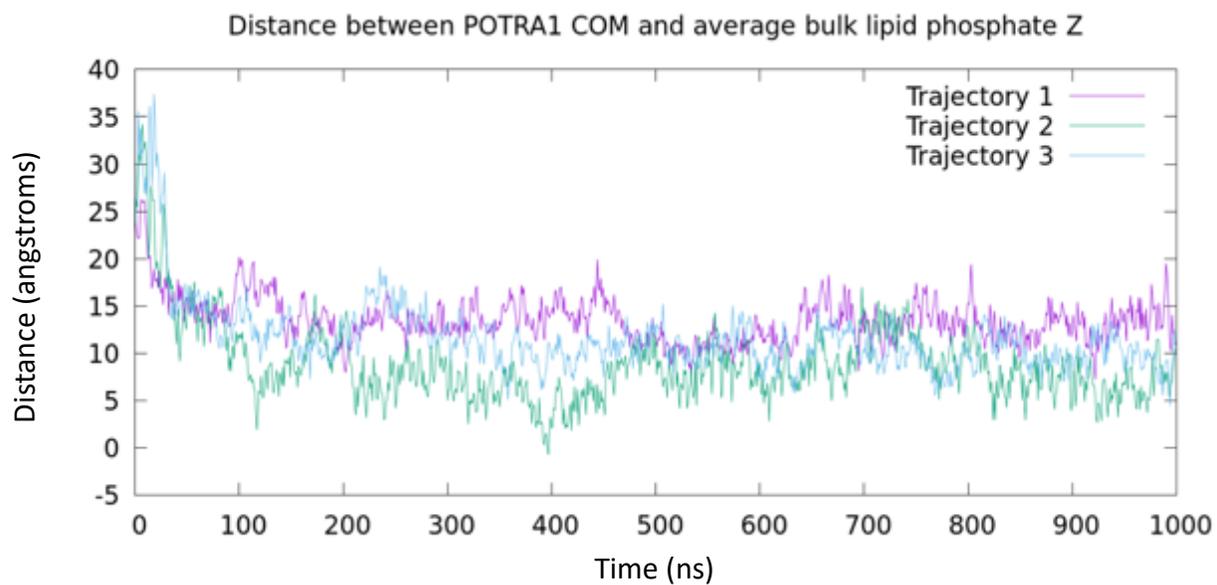
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879 To whom correspondence should be addressed  
880 E-mail: [charles.calmettes@inrs.ca](mailto:charles.calmettes@inrs.ca)

881  
882  
883  
884  
885 This PDF file includes:  
886  
887  
888 Supplementary Figs. S1-S6  
889 Supplementary Tables S1-S2

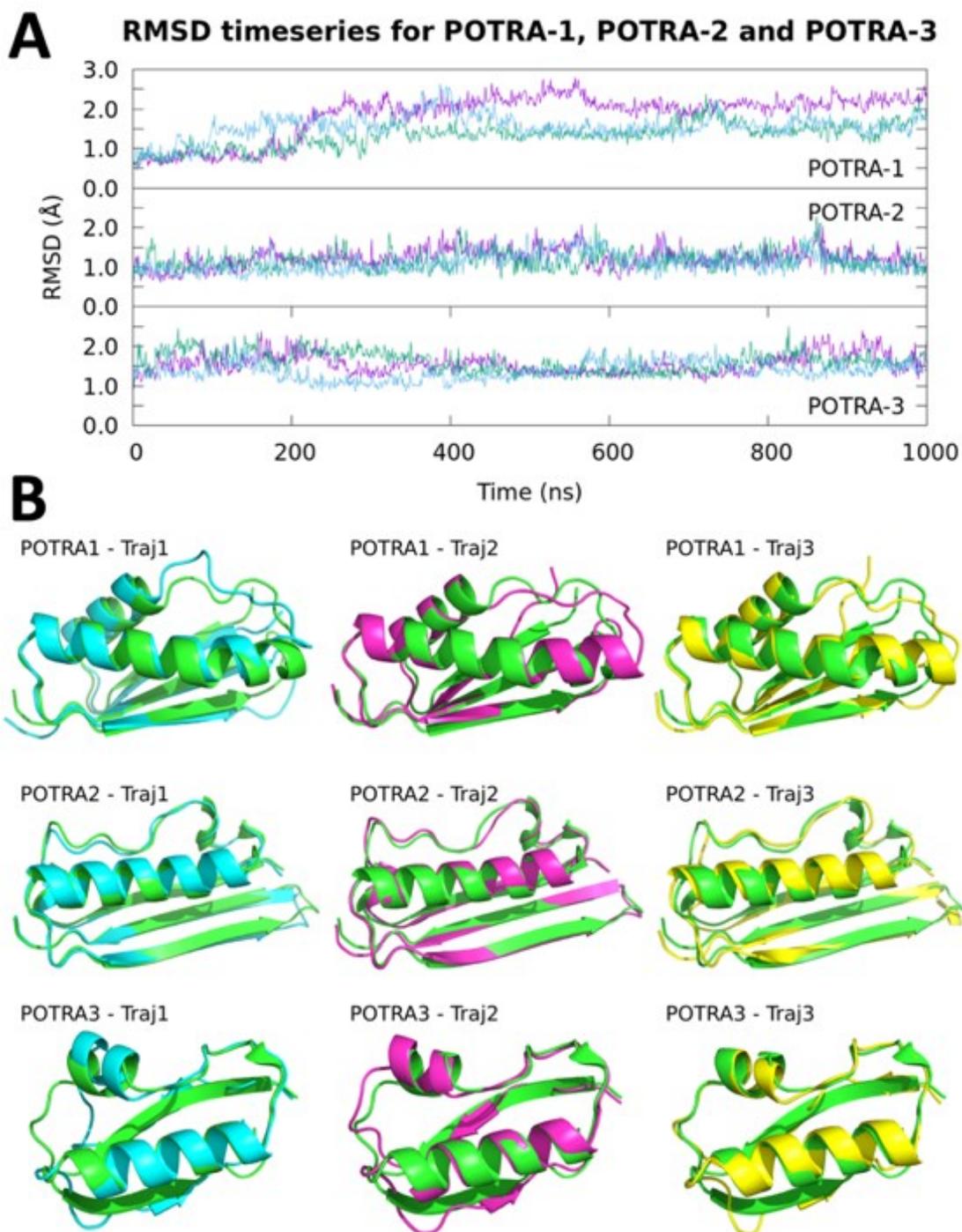


890  
891

892 **Figure S1: POTRA orientation of the BamA and TamA insertases.** (A) The crystal structure of  
 893 *Pa*TamA depicts a configuration in which the POTRA arm is aligned parallel to the membrane. The  
 894 amino-terminal extremity is prominently oriented upwards, extending toward the outer membrane.  
 895 (B) The crystal structure of *Ng*BamA (PDB entry 4K3B) assumes a distinct orientation orthogonal to  
 896 the membrane plane. The amino terminal extremity exhibits a downward projection extending into  
 897 the periplasmic region.



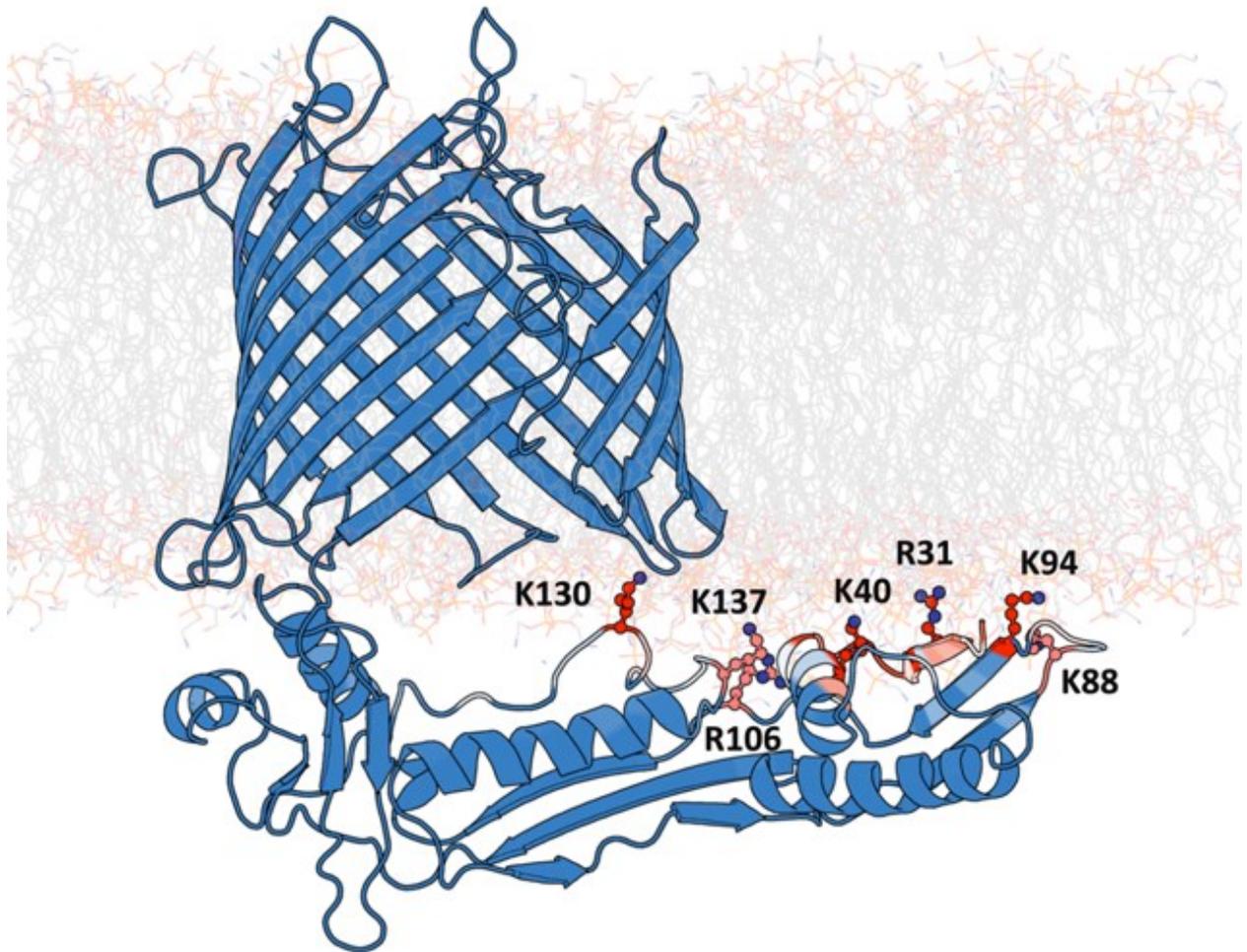
898 **Figure S2: POTRA association with the membrane bilayer.** Time series depicting the evolution  
899 of the POTRA-membrane distance from the three independent TamA-bilayer MD trajectories.



900

902 **Figure S3: POTRA conformation during MD simulation/membrane association.** (A) Time series  
 903 of the root mean square deviation (RMSD) for the POTRA domains from the three TamA-bilayer  
 904 MD trajectories: POTRA-1 (top), POTRA-2 (middle) and POTRA-3 (bottom). (B) Superposition of  
 905 the experimental POTRA domain structures (shown in green) to MD simulation conformations  
 906 (shown in blue, pink and yellow, respectively): POTRA-1 (top), POTRA-2 (middle) and POTRA-3  
 907 (bottom). The superpositions were made using the super command from PyMOL (The PyMOL  
 908 Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). MD conformations are from the final  
 909 trajectory frames.

910

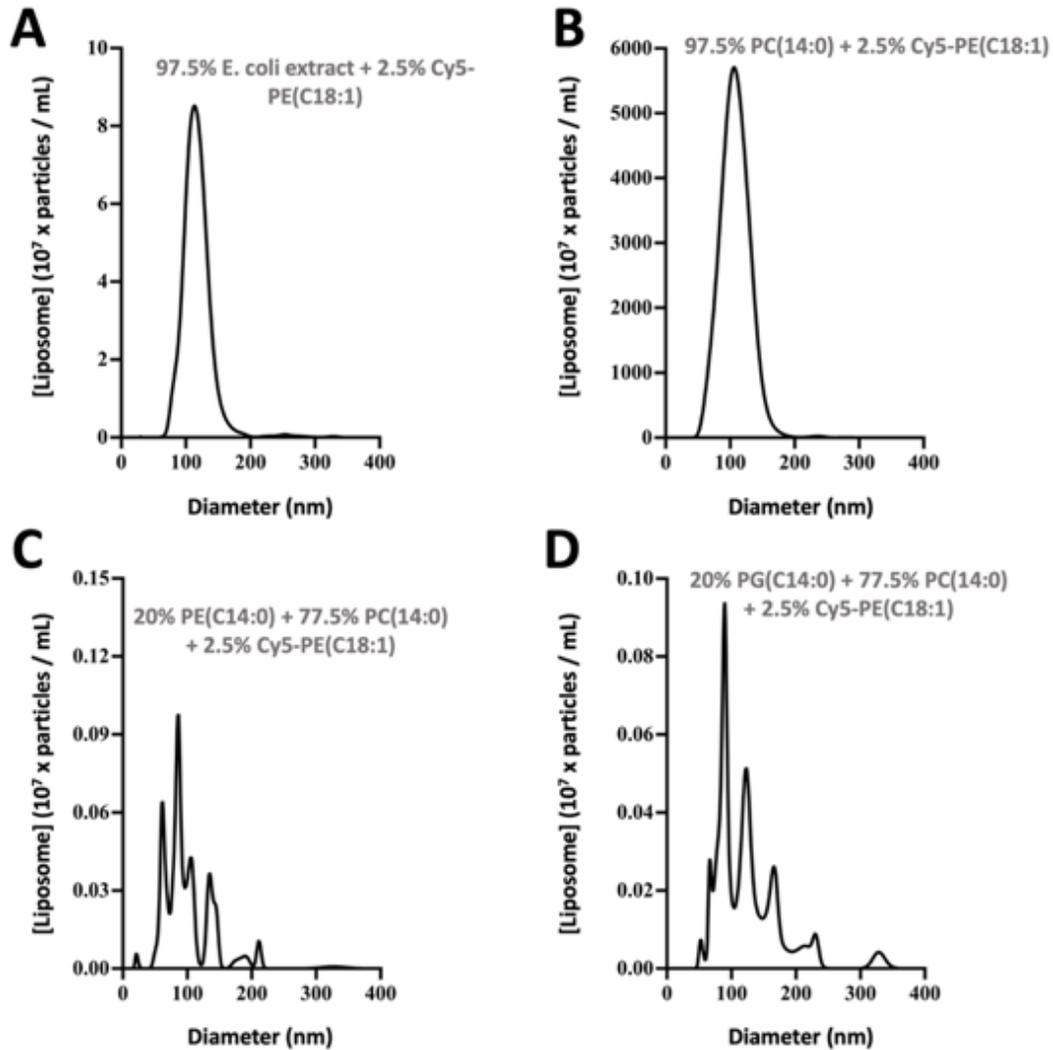


911

912

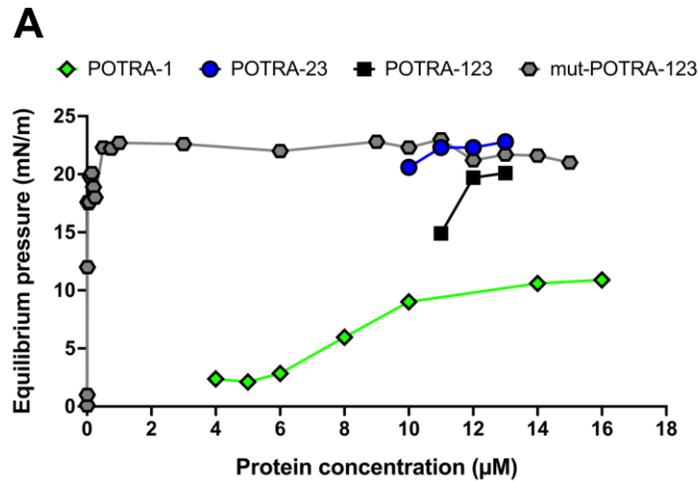
913

914 **Figure S4: Mutated amino acids at the POTRA membrane interface.** The positions of the seven  
915 amino acids (R31, K40, K88, K94, R106, K130, and K137) selected for the introduction of alanine  
916 substitutions are represented in ball-and-stick representation on the membrane-bound conformation  
917 of TamA (MD simulation). This supplementary figure complements the main figure 3A.



918  
919

920 **Figure S5: Homogeneity assessment of lipid vesicles.** The stability and size distributions of various  
 921 lipid vesicle compositions were assessed using a particle tracking analyzer. Initial microscale  
 922 thermophoresis experiments involved Cy5-labeled unilamellar liposomes (with 2.5 mol % of Cy5-PE  
 923 C18:1) composed of *E. coli* polar lipid extract, which were extruded to a size of 100 nm (**A**). To gain  
 924 deeper insight into lipid preferences at the POTRA/membrane interface, we generated liposomes  
 925 composed of phosphatidylcholine (C14:0), phosphatidylethanolamine (C14:00), or  
 926 phosphatidylglycerol (C14:00). The Cy5-labeled phosphatidylcholine vesicles exhibited stability (**B**),  
 927 while the introduction of phosphatidylethanolamine or phosphatidylglycerol (20 mol %) led to the  
 928 formation of heterogeneous vesicle samples that were incompatible with microscale thermophoresis  
 929 (**C**, **D**). Consequently, we opted for a monolayer lipid membrane model to further investigate lipid  
 930 preferences at the POTRA/membrane interface.



**B**

	Lipids	POTRA-1	POTRA-23	POTRA-123	POTRA-123 mutant
MIP (mN/m)	DPPE	37.7 ± 1.3	38.8 ± 1.8	37.7 ± 1.3	
	DPPG	33.0 ± 1.6	32.2 ± 1.7	32.0 ± 0.6	
	DOPE	42.3 ± 1.7	39.8 ± 1.8	39.9 ± 2.0	
	DOPG	53.5 ± 2.0	38.5 ± 1.8	40.0 ± 1.9	31.4 ± 1.3
	80% POPE 20% POPG	43.6 ± 2.0	44.3 ± 1.8	45.8 ± 1.9	39.3 ± 1.7
	<i>E. coli</i> extract	35.4 ± 1.1	37.0 ± 3.3	35.2 ± 1.8	
Synergy	DPPE	0.25 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.25 ± 0.03	
	DPPG	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.25 ± 0.02	
	DOPE	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.03	
	DOPG	0.52 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.15 ± 0.03
	80% POPE 20% POPG	0.25 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.26 ± 0.03
	<i>E. coli</i> extract	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.03	

931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943

**Figure S6: Saturating concentrations, MIP and synergy values for the Langmuir monolayers.** (A) The saturating concentrations of POTRA-1, POTRA-23, POTRA-123, and the septuple mutant (mut-POTRA-123) were determined, and the results revealed surface pressure values of 11 mN/m, 23 mN/m, 20 mN/m, and 22 mN/m, respectively. Notably, the surface pressure at saturating concentrations was comparable for POTRA-23, POTRA-123, and mut-POTRA-123, while POTRA-1 exhibited a significantly lower surface pressure value. This observation may suggest lower surface activity, implying a reduced ability to absorb and occupy the air-water interface, or may suggest a different conformation/orientation at the interface leading to decreased packing at the interface. These differences could be attributed to the distinct flexibility or amphiphilicity of the protein constructs, which resulted in the observed lower surface pressure value for POTRA-1. (B) List of the MIP and synergy values determined for the POTRA/membrane interactions as depicted in the histograms in figure 6.

944 **Supplementary Table 1:** Cloning and mutagenesis primers used in this study.

<b>Mutation</b>	<b>Primers</b>
<i>Pa</i> TamA 25up (BamH1)	GCCGCCGGATCCGAGAGCCAGCTTAGCGTGCGCG
<i>Pa</i> TamA 579down (XhoI)	TCTTCACTCGAGTCACAGTTCTGGCCCCATGGAGAAGTGC
<i>Pa</i> TamA [R31A]	GAGAGCCAGCTTAGCGTGGCCGTCACCCCCGCCAATGC
<i>Pa</i> TamA [K40A]	CGCCAATGCCGCCCTGGCGGCCAATATCGAGGCCTATG
<i>Pa</i> TamA [K88A]	GATCGACAGCGAGGTGGCGGACGGCAAGCCGCCG
<i>Pa</i> TamA [K94A]	GGACGGCAAGCCGCCGGCGCTCACGCTCAAGGTAG
<i>Pa</i> TamA [R106A]	GTGCCCCGGCGAGCCCGTGGCCCTGCGCCAGGTGAATATC
<i>Pa</i> TamA [K130A]	CGCTTGCCGTCGGGCGCGCAGCTGAAACCGGGC
<i>Pa</i> TamA [K137A]	GCTGAAACCGGGCGCGGCGCTGAACCAGGGTGTC
POTRA 1 and 123 25up (AflII)	TTTAACCTTAAGAAGGAGATATACTATGGAGAGCCAGCT TAGCGTGCGC
POTRA 23 and 123 270down (PstI)	GTAGAGGTTCTCTGCAGGCTTGCGCGCCTCCAGCCG
POTRA-23 105up (AflII)	TTTAACCTTAAGAAGGAGATATACTATGGTGCGCCTGCGC CAGG
POTRA-1 104down (PstI)	GTAGAGGTTCTCTGCAGGGGGCTCGCCGGGCACTAC

945

946 **Supplementary Table 2:** Sequence accessions for POTRA conservation analysis

<b>Species</b>	<b>Class</b>	<b>TamA/TamL</b>	<b>BamA</b>
<i>Martelella alba</i>	alphaproteobacteria	TKI08572.1	WP_141146965.1
<i>Alphaproteobacteria bacterium</i>	alphaproteobacteria	MBZ0154973.1	MBW7910986.1
<i>Thalassocella blandensis</i>	alphaproteobacteria	VUD42516.1	VUD68225.1
<i>Rhizobium sp</i>	alphaproteobacteria	MBW8311940.1	MBW8312465.1
<i>Rickettsiales bacterium</i>	alphaproteobacteria	MBB65933.1	MBB67966.1
<i>Phenylobacterium kunshanense</i>	alphaproteobacteria	WP_240606325.1	WP_111274442.1
<i>Burkholderia mallei</i>	betaproteobacteria	WP_004192380.1	WP_004197083.1
<i>Denitromonas sp.</i>	betaproteobacteria	WP_214360373.1	WP_214359927.1
<i>Neisseria meningitidis</i>	betaproteobacteria	AAF42442.1	WP_002243947.1
<i>Nitrosomonas europaea</i>	betaproteobacteria	WP_276677772.1	WP_276677403.1
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	gammaproteobacteria	WP_265411081.1	WP_005596454.1
<i>Escherichia coli</i>	gammaproteobacteria	WP_001269327.1	WP_001240896.1
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	gammaproteobacteria	WP_005640909.1	WP_005640164.1
<i>Legionella pneumophila</i>	gammaproteobacteria	WP_061636414.1	WP_061692498.1
<i>Marinobacter nauticus</i>	gammaproteobacteria	WP_049756880.1	WP_206855876.1
<i>Pasteurella multocida</i>	gammaproteobacteria	WP_014326433.1	WP_014391414.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gammaproteobacteria	WP_004343881.1	WP_003092382.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	gammaproteobacteria	WP_011334992.1	WP_011332689.1
<i>Salmonella bongori</i>	gammaproteobacteria	WP_219996940.1	WP_171922382.1
<i>Serratia marcescens</i>	gammaproteobacteria	WP_028127570.1	WP_033639522.1
<i>Vibrio cholerae</i>	gammaproteobacteria	WP_179876475.1	WP_174566448.1
<i>Xanthomonas campestris</i>	gammaproteobacteria	WP_169707563.1	WP_169705555.1
<i>Yersinia pestis</i>	gammaproteobacteria	EFA48387.1	EFA46613.1
<i>Fundidesulfovibrio terrae</i>	deltaproteobacteria	WP_243359612.1	WP_243358873.1
<i>Desulfonatronovibrio sp</i>	deltaproteobacteria	RQD66714.1	RQD65590.1
<i>Deltaproteobacteria bacterium</i>	deltaproteobacteria	NIO15613.1	RLB65607.1
<i>Mailhella massiliensis</i>	deltaproteobacteria	WP_083717230.1	WP_077073312.1
<i>Campylobacter jejuni</i>	epsilonproteobacteria	VTQ56984.1	VTQ58081.1
<i>Bacteroidales bacterium</i>	bacteroidetes	MCK9563299.1	MCK9561840.1
<i>Tenacibaculum sp.</i>	bacteroidetes	GFD78856.1	GFD75654.1

947