

Transporteurs MDR

(Projet de Recherche 2004)

Etude structurale et fonctionnelle d'un transporteur de multiples drogues (MDR) de *Bacillus subtilis*, BmrA, et régulation cellulaire des différents transporteurs MDR chez cette bactérie

http://www-dsv.cea.fr/content/cea/d_dep/d_drdc/d_bmc/aci.htm

CONTEXTE

Les transporteurs de multiples drogues, ou transporteurs MDR ("MultiDrug Resistance"), jouent un rôle central dans les mécanismes de détoxification cellulaire non seulement dans des conditions physiologiques, mais également lors de pathologies sévères où ils permettent, aussi bien aux micro-organismes pathogènes qu'aux cellules cancéreuses, de résister aux traitements de chimiothérapies. Les programmes de séquençage ont révélé la présence de nombreux transporteurs MDR potentiels chez la plupart des bactéries, dont le rôle, le mécanisme de fonctionnement, et la coordination de leur expression au niveau cellulaire restent à élucider.

OBJECTIFS

L'étude de protéines membranaires, tant au niveau moléculaire que cellulaire, représente à l'heure actuelle un défi considérable pour les scientifiques et notre projet s'inscrit dans ce contexte : il a pour but, d'une part, de caractériser le mécanisme de fonctionnement moléculaire d'un transporteur modèle de multiples drogues de type ABC ("ATP-Binding Cassette") que nous avons récemment identifié (BmrA pour "Bacillus multidrug resistance ATP") et, d'autre part, d'analyser la coordination de l'expression de l'ensemble des transporteurs MDR, connus ou suspectés, chez *Bacillus subtilis*, l'archétype des bactéries à Gram positifs.

PROJET

L'approche structurale de BmrA est réalisée par cristallographie aux rayons X et cristallographie électronique, et l'approche fonctionnelle (fixation des substrats, ATP et drogues, et changements de conformation induits) fait appel aux techniques de transfert de fluorescence, résonance paramagnétique électronique, microscopie à force atomique haute résolution en milieu liquide. Les résultats obtenus sont confrontés aux modèles moléculaires de BmrA dont nous disposons et qui sont obtenus par modélisation à partir des trois structures connues pour le transporteur ABC homologue, MsbA.

Concernant la coordination de l'expression des transporteurs MDR au niveau cellulaire, nous analysons l'effet de différentes conditions de cultures (comme par exemple la présence de certains antibiotiques) sur la synthèse et l'accumulation, dans la membrane plasmique de *Bacillus*, des différents transporteurs MDR. Pour cela, nous associons à la fois des approches protéomique (spectrométrie de masse : utilisation de la plateforme Grenobloise du CEA, collaboration avec Jérôme Garin) et transcriptome (puce à ADN : utilisant de la plateforme Marseille-Génotopole).

LABORATOIRES IMPLIQUES

Equipe J.-M. Jault, BMC/DRDC, UMR 5090, Grenoble
Equipe A. Di Pietro, IBCP, UMR 5086, Lyon
Equipe R. Haser, IBCP, UMR 5086, Lyon
Equipe F. Denizot, LCB/IBSM, UPR 9043, Marseille
Equipe J.-L. Rigaud, Institut Curie, UMR 168 Paris

CALENDRIER

Réunions bilatérales régulières entre le coordonnateur, J.-M. Jault, et les différentes équipes participant au projet (notamment l'équipe A. Di Pietro et R. Haser : réunion mensuelle).
Janvier 2005 : réunion des membres de 4 équipes (J.-M. Jault, A. Di Pietro et R. Haser, J.-L. Rigaud).
Juin 2005 : réunion des membres de 3 équipes (J.-M. Jault, R. Haser et J.-L. Rigaud).

MOTS CLES

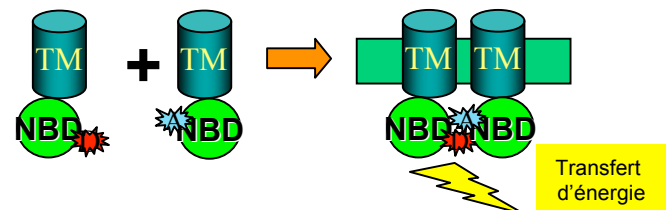
MDR ("MultiDrug Resistance"), transporteurs, chimio-résistance, ABC ("ATP-Binding Cassette"), BmrA, changements de conformation, modélisation moléculaire, surexpression, protéomique.

PUBLICATIONS PRINCIPALES

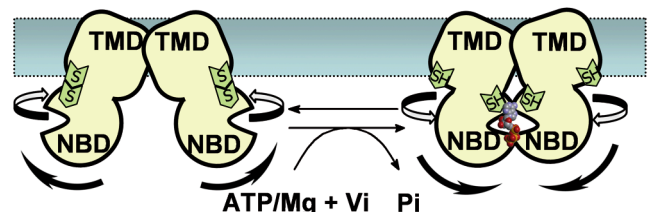
- [1] E. Steinfelds, C. Orelle, J.-R. Fantino, O. Dalmas, F. Denizot, J.-L. Rigaud, A. Di Pietro & J.-M. Jault. *Biochemistry* (2004) 43, 7491-7502 "Characterisation of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*."
- [2] O. Dalmas, M.-A. Do Cao, M. R. Lugo, F. J. Sharom, A. Di Pietro & J.-M. Jault. *Biochemistry* (2005) 44, 4312-4321 "Time-resolved fluorescence resonance energy transfer shows that the bacterial multidrug ABC half-transporter BmrA functions as a homodimer."
- [3] O. Dalmas, C. Orelle, A.-E. Foucher, C. Geourjon, S. Crouzy, A. Di Pietro & J.-M. Jault. *Manuscrit soumis à publication* "Large conformational changes in a Bacterial Multidrug ABC transporter whose resting-state conformation supports that of *E. coli* MsbA."
- [4] C. Orelle, S. Marco, L. Jouan, J.-L. Rigaud, P. Gros, A. Di Pietro & J.-M. Jault. *Manuscrit en préparation* "ATP-driven dimerization of nucleotide-binding domains is a highly energetic catalytic step of ABC transporters"
- [5] S. Ravaut, M.-A. Do-Cao, M. Jidenko, C. Ebel, M. le Maire, J.-M. Jault, A. Di Pietro, R. Haser & N. Aghajari *Manuscrit en préparation* "The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer in the detergent-solubilised state".

RESULTATS PRINCIPAUX

- Un transfert d'énergie de fluorescence entre deux monomères marqués par deux sondes différentes (D, donneur et A, accepteur) montre que BmrA fonctionne sous la forme d'un homodimère [2].



- A l'état de repos (en absence de drogues), BmrA existe en équilibre entre deux conformations extrêmes. L'une ouverte et l'autre fermée [3].



- Les premiers cristaux obtenus sont malheureusement petits (voir figure ci-dessous) et diffractent mal, et nous avons optimisé les conditions de purification afin d'essayer d'améliorer leur qualité [5].

