



**HAL**  
open science

# Caractérisation structurale et fonctionnelle du transporteur de multiples drogues, BmrA par cryo-EM : création d'outils pour les études biophysiques et biochimiques des protéines membranaires

Alexia Gobet

► **To cite this version:**

Alexia Gobet. Caractérisation structurale et fonctionnelle du transporteur de multiples drogues, BmrA par cryo-EM : création d'outils pour les études biophysiques et biochimiques des protéines membranaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10111 . tel-04573905

**HAL Id: tel-04573905**

**<https://theses.hal.science/tel-04573905v1>**

Submitted on 13 May 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale N° 205**

**Interdisciplinaire Sciences Santé**

**Discipline : Biochimie**

Soutenue publiquement le 12/07/2023, par :

**Alexia Gobet**

---

**Caractérisation structurale et fonctionnelle du transporteur  
de multiples drogues, BmrA par cryo-EM ; Création d'outils  
pour les études biophysiques et biochimiques des protéines  
membranaires**

---

Devant le jury composé de :

Dr Valérie Biou Rapporteure  
Rapporteuse Chargé de recherche, Institut de biologie physico-chimique des  
protéines membranaires

Dr Hugues Nury Rapporteur  
Directeur de recherche, Institut de biologie structurale

Dr Stéphanie Ravaud Examinatrice  
Maitre de conférence, Laboratoire de Microbiologie moléculaire et biochimie structurale

Dr Isabelle Broutin Présidente  
Directrice de recherche, Laboratoire Cibles thérapeutiques et conception de  
médicaments

Dr Stéphane Bressanelli Examineur  
Directeur de recherche, Institut de biologie intégrative de la  
cellule

Dr Pierre Falson Directeur de thèse  
Directeur de recherche, Laboratoire de Microbiologie moléculaire et biochimie structurale

Dr Vincent Chaptal Co-directeur de thèse  
Chargé de recherche, Laboratoire de Microbiologie moléculaire et biochimie structurale



## Table des matières

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>9</b>
--------------------------	----------

<b>PREAMBULE .....</b>	<b>11</b>
------------------------	-----------

<b>PARTIE 1 : METHODOLOGIE POUR L'ETUDE DES PROTEINES MEMBRANAIRES.....</b>	<b>15</b>
---	-----------

<b>I. L'EXPRESSION DES PROTEINES MEMBRANAIRES .....</b>	<b>15</b>
A. LA SUREXPRESSION DES PROTEINES MEMBRANAIRES .....	15
B. LES CAVEOLES .....	20
C. SUREXPRESSION DE BMRA DANS DES CAVEOLES.....	22
D. PUBLICATION 1 : OVEREXPRESSION OF THE ABC TRANSPORTER BMRA WITHIN INTRACELLULAR CAVEOLÆ IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	27
<b>II. COMPORTEMENT DES DETERGENTS .....</b>	<b>28</b>
A. LES DETERGENTS : PRESENTATION GENERALE .....	29
B. LES DETERGENTS : FONCTIONNEMENT .....	31
C. CARACTERISATION DE LA COURONNE DE DETERGENT.....	32
D. LES DETERGENTS : COMPORTEMENT PENDANT LA CONCENTRATION .....	33
E. POINTS MAJEURS DE L'ARTICLE .....	35
F. PUBLICATION 2 : THE NON-NEWTONIAN BEHAVIOR OF DETERGENTS DURING CONCENTRATION IS INCREASED BY MACROMOLECULES, IN <i>TRANS</i> , AND RESULTS IN THEIR OVER-CONCENTRATION .....	37
<b>III. OBSERVATION DE LA COURONNE AMPHIPHILE EN CRYO-EM .....</b>	<b>38</b>
A. GENERALITES SUR LA CRYO-EM .....	38
B. LE MICROSCOPE EN QUELQUES MOTS .....	40
C. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSTRUCTION DU MODELE .....	41
D. LES DETERGENTS EN CRYO-EM .....	42
E. POINTS MAJEURS DE L'ARTICLE .....	44
F. PUBLICATION 3 : CRYO-EM RECONSTRUCTIONS OF MEMBRANE PROTEINS SOLVED IN SEVERAL AMPHIPATHIC SOLVENTS, NANODISC, AMPHIPOL AND DETERGENTS, YIELD AMPHIPATHIC BELTS OF SIMILAR SIZES CORRESPONDING TO A COMMON ORDERED SOLVENT LAYER .....	46
G. PUBLICATION 4 : CRYO-EM DATA ANALYSIS OF MEMBRANE PROTEINS. PRACTICAL CONSIDERATIONS ON AMPHIPATHIC BELTS, LIGANDS AND VARIABILITY ANALYSIS .....	47
<b>IV. ANALYSE 3D DU MOUVEMENT D'UNE PROTEINE ET « VARIABILITY REFINEMENT » .....</b>	<b>48</b>
A. POINTS MAJEURS DE L'ARTICLE.....	48
B. PUBLICATION 5 : CONFORMATIONAL SPACE EXPLORATION OF CRYO-EM STRUCTURES BY VARIABILITY REFINEMENT .....	50
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>51</b>

<b>PARTIE 2 : ETUDE MECANISTIQUE DU TRANSPORTEUR ABC DE MULTIPLE DROGUES BMRA .....</b>	<b>53</b>
---	-----------

<b>I. MISE EN CONTEXTE .....</b>	<b>53</b>
----------------------------------	-----------

A.	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....	53
B.	LES POMPES D'EFFLUX .....	59
C.	GENERALITES SUR LES TRANSPORTEURS ABC .....	62
D.	BIOMECHANIQUE DES ABC .....	66
E.	BMRA : <i>BACILLUS SUBTILIS MULTIDRUG RESISTANCE ATP</i> .....	69
F.	1 <sup>ERE</sup> STRUCTURE 3D DE BMRA, POINTS MAJEURS DE L'ARTICLE .....	71
G.	PUBLICATION 6 : SUBSTRATE-BOUND AND -FREE OUTWARD-FACING STRUCTURES OF A MULTIDRUG ABC TRANSPORTER .....	74
<b>II.</b>	<b>RESULTATS :</b> .....	<b>75</b>
A.	PASSAGE D'UN COMPORTEMENT MICHAELIEN A ALLOSTERIQUE EN REPONSE A LA FIXATION D'UN SUBSTRAT 75	
B.	VARIABILITE 3D DE BMRA .....	84
C.	DISCUSSION DES RESULTATS .....	87
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>90</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>92</b>
A.	EXPRESSION .....	92
B.	PURIFICATION.....	93
C.	ETUDE FONCTIONNELLE .....	94
D.	ETUDE STRUCTURALE PAR CRYO-EM : PREPARATION DES GRILLES .....	94
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>96</b>

## Table des Figures

Figure 1 : Schéma des étapes à suivre de la culture à la résolution de structure et ma contribution dans chacune d'elles .....	12
Figure 2 : Evolution du nombre de structures de protéines membranaires .....	13
Figure 3 : Vue d'ensemble des grandes étapes de la biosynthèse d'une protéine membranaire .....	16
Figure 4 : Schéma de la biosynthèse des protéines membranaires chez les bactéries .....	17
Figure 5 : Clichés de microscopie électronique d'E. coli C41(DE3) surexprimant la sous-unité b de l'ATP synthase $F_1F_0$ . .....	18
Figure 6 : Clichés de microscopie électronique de différents types cellulaires contenant des cavéoles.....	20
Figure 7 : Structure d'un complexe de cavéoline-1 .....	21
Figure 8 : Courbure de la membrane et formation de la cavéole.....	22
Figure 9 : Mécanisme général de fonctionnement des exportateurs ABC.....	23
Figure 10 : Surexpression de BmrA en cavéoles chez E. coli.....	24
Figure 11 : Mesure de l'activité de transport du Hoescht33342 par BmrA.....	25
Figure 12 : Représentation schématique des différentes vésicules formées .....	26
Figure 13 : Représentation schématique de quelques systèmes amphiphiles.....	28
Figure 14 : Représentations schématiques des détergents.....	29
Figure 15 : Exemples de formule chimique de détergents .....	30
Figure 16 : Représentation graphique de la tension de surface en fonction de la concentration en détergent.....	30
Figure 17 : Etapes de la solubilisation d'une protéine membranaire par les détergents.....	31
Figure 18 : Formules chimiques de deux détergents récemment développés.....	32
Figure 19 : Caractérisation de la couronne de détergents autour de BmrA.....	33
Figure 20 : Chromatogramme de SEC de BmrA purifiée en FC12, DDM et LMNG .....	34
Figure 21 : Courbe rhéologique des différents types de fluides .....	35
Figure 22 : Quelques avantages et inconvénients de chacune des techniques de résolution de structure des protéines. ....	38
Figure 23 : Evolution croissante du nombre de structures résolues par cryo-EM depuis les années 2000 déposées dans la PDB .....	39
Figure 24 : Les différentes étapes pour la résolution d'une structure en cryo-EM.....	39
Figure 25 : Schéma simplifié des composants d'un microscope.....	41
Figure 26 : Classification 2D de micelles de détergents ou de BmrA.....	43
Figure 27 : Mode d'action des antibiotiques .....	53
Figure 28 : Différence entre la paroi cellulaire des bactéries Gram positif et négatif.....	54
Figure 29 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	56
Figure 30 : Formule chimique d'un antibiotique et son adjuvant .....	58
Figure 31 : Représentation des différentes familles de transporteurs bactériens de multidrogues .....	59
Figure 32 : Topologie commune des transporteurs ABC .....	63
Figure 33 : Arrangement linéaire des motifs dans la séquence d'un transporteur ABC .....	64
Figure 34 : Hélices de couplage dans la structure de BmrA.....	64

Figure 35 : Vue d'ensemble des différentes classes de transporteurs ABC.....	66
Figure 36 : Schéma d'un NBS de TM287/288, un exportateur hétérodimérique bactérien de type IV .....	67
Figure 37 : Deux mécanismes proposés pour les transporteurs ABC .....	68
Figure 38 : Modèle 3D des roulettes de BmrA en conformation IF obtenus par cryo-EM à 25 Å de résolution .....	70
Figure 39 : Fixation d'ATP-Mg <sup>2+</sup> sur BmrAE04A en présence ou absence de rhodamine 6G ..	76
Figure 40 : Micrographe et classes 2D .....	77
Figure 41 : Traitement des données typique d'une collecte de BmrA .....	78
Figure 42 : Tableau des données de structures .....	79
Figure 43 : Carte de cryo-EM des sites de fixation de la R6G dans chaque monomère en conformation IF .....	81
Figure 44 : Modèles de BmrAE504A pour chacune des conditions. ....	82
Figure 45 : Superposition des structures en IF.....	83
Figure 46 : Superposition des structures en OF .....	84
Figure 47 : Cartes et modèles issus du 3DVA pour la composante 1 du jeu BmrA <sup>R6G</sup> .....	86
Figure 48 : Variabilité 3D de E504A <sup>Apo</sup> et E504A <sup>R6G</sup> .....	87
Figure 49 : Modèle du mécanisme d'efflux du substrat .....	88
Figure 50 : Schéma réactionnel impliqué dans la mesure de l'activité ATPase.....	94

## ABREVIATIONS

3DVA : **3D** variability analysis  
7AAD : **7-aminoactinomycine D**  
ABC : **ATP-binding cassette**  
AbgT : **p-aminobenzoyl-glutamate transporter**  
Abs : **Absorbance**  
ADN : **Acide désoxyribonucléique**  
ADP : **Adénodine diphosphate**  
ARN : **Acide ribonucléique**  
ARNm : **Acide ribonucléique messenger**  
ARNt : **Acide ribonucléique de transfert**  
ATP : **Adenosine triphosphate**  
BmrA : ***Bacillus subtilis* multidrug resistance ATP**  
BSA : **Bovine serum albumin**  
Cav : **Cavéoline-1**  
CH : **Coupling helix**  
CMC : **Concentration micellaire critique**  
Cryo-EM : **Cryo-electron microscopy**  
DAP : **Acide diaminopimélique**  
DCOD : **Dicarboxylate-oxide detergent**  
DDM : **Dodécyl-β-D-maltoside**  
DEER : **double electron-electron resonance**  
DMPC : **dimyristoylphosphatidylcholine**  
DOPC : **dioléoylphosphatidylcholine**  
FC12 : **Foscholine 12**  
FRET : **Fluorescence resonance energy transfert**  
GDN : **glycol-diosgenin**  
GPCR : **G protein-coupled receptor**  
GST : **glutathion S-transférase**  
ICD : **Intracellular domain**  
IF : **Inward-facing**  
KeV : **kiloelectronvolt**  
LMNG : **Lauryl maltose neopentyl glycol**  
LPS : **Lipopolysaccharide**  
MALDI-ToF MS : **Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry**  
MATE : **Multidrug and toxic compound extrusion**  
MBP : **Maltose-binding protein**  
MDR : **Multidrug resistance**  
MFP : **Membrane fusion protein**  
Mistic : **Membrane-integrating sequence for translation of inner membrane protein constructs**

MFS : **M**ajor **f**acilitator **s**uperfamily  
NAG : **N**-acétyl-**g**lucosamine  
NAM : acide **N**-acétyl-**m**uramique  
NBD : **N**ucleotide-**b**inding **d**omain  
NBS : **N**ucleotide-**b**inding **s**ite  
OF : **O**utward-**f**acing  
OMF : **O**uter-**m**embrane **f**actor  
PABA : **p**ara-**a**mino**b**enzoic **a**cid  
PACE : **P**roteobacterial **a**ntimicrobial **c**ompound **e**fflux  
PDB : **P**rotein **d**ata **b**ank  
PE : **P**hosphatidyléthanola**m**ine  
P-gp : **P**-**g**lycoprotein  
Pi : **P**hosphate inorganique  
PS : **P**hosphatidylsérine  
R6G : **R**hodamine **6G**  
RMN : **R**ésonance **m**agnétique **n**ucléaire  
RMSD : **R**oot-**m**ean-**s**quare **d**eviation  
RNC : **R**ibosome-**n**ascent chain **c**omplex  
RND : **R**esistance-**n**odulation-**c**ell **d**ivision  
RPE : **R**ésonance **p**aramagnétique **é**lectronique  
SBP : **S**ubstrate-**b**inding **p**rotein  
SDS : **S**odium **d**odecyl sulfate  
SEC : **S**ize **e**xclusion **c**hromatography  
SMALP : **S**tylene-**m**aleic acid **l**ipid **p**articles  
SMR : **S**mall **m**ultidrug **r**esistance  
SPA : **S**ingle **p**article **a**nalysis  
SRP : **S**ignal **r**ecognition **p**article  
TMD : **T**ransmembrane **d**omain  
TRPV : **T**ransient receptor **p**otential **v**anilloide  
VAMP : **V**esicle-**a**ssociated **m**embrane **p**rotein  
Vi : Vanadate  
X-ray : Cristallographie

## Avant-propos

La résistance aux antibiotiques est un phénomène responsable de centaines de milliers de décès par an, un chiffre qui ne cesse de croître ; c'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé lui accorde une grande priorité. Face à l'urgence, elle a déployé depuis 2015 un plan d'action mondial visant à réduire la résistance aux antimicrobiens et améliorer la compréhension du phénomène. Différents mécanismes participent à cette résistance, et durant ma thèse je me suis intéressée à celui mis en œuvre dès l'agression chimique pour y répondre. Ce mécanisme est l'élimination de l'antibiotique hors de la cellule par les transporteurs de type ATP-Binding Cassette, ABC. Ces protéines membranaires expulsent les antibiotiques à l'extérieur des microorganismes en utilisant l'énergie fournie par la fixation et l'hydrolyse d'ATP. Ils constituent la première ligne de défense. Le transporteur ABC sur lequel a porté ma thèse est BmrA, pour *Bacillus subtilis multidrug resistance ATP*, de la bactérie *Bacillus subtilis*. Ce transporteur bactérien, qualifié de *multidrug resistance*, MDR, a effectivement la capacité d'expulser des molécules de structures différentes. La conséquence de cette propriété a un impact thérapeutique majeur car une fois que l'expression de ce type de protéines est déclenchée, la bactérie devient résistante à la plupart des antibiotiques, acquérant le phénotype MDR. On retrouve ce type de protéines dans toutes les cellules, de l'Homme à la bactérie. Leur découverte depuis une cinquantaine d'années a permis d'établir un consensus global sur leur mécanisme de fonctionnement. Mes travaux permettent d'aller plus loin dans la compréhension moléculaire du mécanisme d'efflux et de la polyspécificité qui caractérisent ces protéines. Ces dernières sont localisées à la périphérie des cellules, insérées dans la membrane plasmique. Cette localisation membranaire, partagée par 25 à 30% des protéines codées par nos génomes, confère à ces protéines des propriétés particulières d'interaction avec les lipides qui constituent les membranes biologiques. A ce titre, j'ai dû aborder des aspects méthodologiques pour faciliter l'étude de ce type d'enzyme qui fonctionnent dans un environnement hétérogène.

Ce manuscrit est constitué de deux parties : une première axée sur la méthodologie pour l'étude des protéines membranaires et une deuxième dans laquelle j'étudie la mécanistique de BmrA en mettant en application certains outils développés dans la première partie.

Dans la première partie, les travaux réalisés portent sur différentes phases de l'étude d'une protéine membranaire :

### **Expression de la protéine d'intérêt :**

Dans un premier temps j'ai évalué l'enrichissement en BmrA de cavéoles dans un contexte bactérien. J'ai ainsi testé la faisabilité de ce concept en coexprimant BmrA avec la cavéoline-1 canine, marqueur moléculaire des cavéoles dont l'expression induit la formation de vésicules membranaires, les cavéoles. J'ai ensuite réalisé des tests fonctionnels pour caractériser BmrA dans ce système d'expression, en évaluant le gain sur ses activités de transport et d'hydrolyse d'ATP couplée à celui-ci.

### **Purification de la protéine d'intérêt :**

Je me suis ensuite intéressée au comportement des détergents pendant l'étape de concentration des protéines membranaires isolées par chromatographie. En effet, durant les phases de la purification il est nécessaire de concentrer l'échantillon avant de passer à l'étape

suivante et en particulier pour les études structurales, notamment par cryomicroscopie électronique (cryo-EM) comme ce fut le cas durant ma thèse.

#### **Etude structurale :**

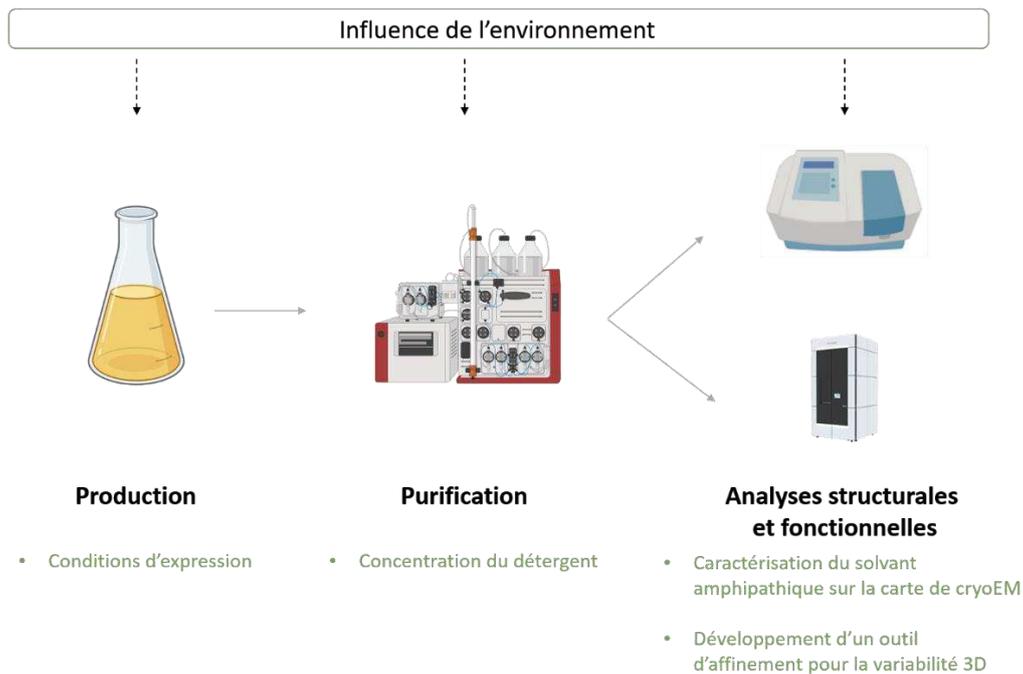
Une fois BmrA exprimée et purifiée, j'ai abordé le traitement des données collectées par cryo-EM. J'ai tout d'abord réalisé une étude portant sur l'observation de la couronne amphipathique lors du traitement des données. J'ai également travaillé sur la variabilité tridimensionnelle observée dans les analyses des données cryo-EM. Ainsi, en collaboration avec les développeurs de Phenix, j'ai participé au développement d'un outil permettant d'affiner les modèles dans les différentes cartes de densité issues de l'analyse de la variabilité de la protéine d'intérêt, dans mon cas BmrA. Cela permet de modéliser les différents états de transition constituant le mouvement de la protéine afin qu'elle assure sa fonction.

La deuxième partie de mes travaux repose sur l'étude de BmrA avec laquelle j'ai utilisé les outils développés dans la première partie. L'export du substrat réalisé par BmrA se fait par l'intermédiaire de conformations que la protéine adopte successivement pour déplacer la molécule à travers la membrane plasmique. Elle passe ainsi d'un état dans lequel elle est ouverte face au cytoplasme, dit inward-facing (IF) vers un état dans lequel elle expose la molécule à l'extérieur de la cellule, dit outward-facing (OF). J'ai isolé les différents intermédiaires conformationnels de la transition IF - OF. En particulier, j'ai montré que BmrA adopte un mode de fixation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> michaélien ou allostérique, selon l'absence ou la présence de molécule transportée, dans ce cas un colorant synthétique fluorescent, la rhodamine 6G. J'ai résolu la structure cryo-EM de plusieurs intermédiaires conformationnels d'une version mutée de BmrA dans laquelle l'hydrolyse d'ATP n'est plus possible en variant la concentration de nucléotide dans l'échantillon. J'ai analysé en particulier la flexibilité de chacune de ces conformations et les ai comparées, mettant en évidence les réarrangements moléculaires que le transporteur effectue pour assurer sa polyspécificité.

## Préambule

Les cellules sont constituées d'un ensemble de compartiments dont les frontières sont définies par des membranes biologiques. Ces membranes sont étanches aux molécules organiques et ions, ce qui permet de ségréger les réactions chimiques dans l'espace concerné et permet ainsi le développement de processus chimiques complexes. Cette étanchéité restreint cependant l'étendue des réactions possibles et pour y pallier, les cellules positionnent dans ces membranes des protéines chargées de transmettre des signaux, échanger, importer des nutriments et exporter des composés toxiques, incluant nombre de processus nécessaires au fonctionnement cellulaire. Cette liste, non exhaustive, rend compte de l'importance de ces protéines, dites membranaires. L'analyse des génomes prédit que 25 à 30% du protéome correspond à des protéines membranaires, *i.e* présentant au moins un segment d'une vingtaine de résidus majoritairement hydrophobes (Wallin et von Heijne 1998). La plupart de ces protéines est localisée à la membrane plasmique, qui définit le contour des cellules, ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix. De fait, elles représentent les 2/3 des cibles de médicaments (Overington, Al-Lazikani, et Hopkins 2006). La connaissance de leur structure et des conformations possibles de même que la compréhension de leur mécanisme est alors fondamentale. Différentes méthodes existent pour étudier ces objets, allant des études moléculaires et biochimiques sur la protéine isolée, vers des systèmes plus complexes d'étude en cellule ou sur l'organisme. Je me focaliserai ici sur le premier type d'études, utilisant la biochimie structurale pour comprendre au niveau moléculaire leur fonctionnement.

Un cheminement essentiel à l'étude biochimique et structurale des protéines repose sur le schéma simplifié présenté en Figure 1, où il est nécessaire de produire la protéine d'intérêt afin de la purifier et l'étudier par diverses méthodes biochimiques, biophysiques et structurales. Au cours de mon manuscrit, je vais suivre ce schéma et l'enrichir progressivement.



*Figure 1 : Schéma des étapes à suivre de la culture à la résolution de structure et ma contribution dans chacune d'elles*

Mes contributions au niveau de chaque étape sont écrites en vert.

Tout d'abord, un point essentiel est à noter : avant le début de ma thèse, la méthode de choix pour résoudre la structure des protéines membranaires était la cristallographie. Cette technique est particulièrement laborieuse dans le cas des protéines membranaires dont l'hydrophobicité de la région membranaire s'accommode mal des concentrations élevées nécessaires pour produire les cristaux de protéine. La présence de détergent qui entoure la région membranaire et la protège de l'eau environnante complexifie aussi la production de cristaux. La formation d'un cristal nécessite en effet des contacts intermoléculaires mais le volume occupé par les molécules de détergents empêche ce contact et complique donc la création du cristal qui s'avère de plus fragile, difficile à manipuler et sensible aux dommages causés par les radiations. Pour toutes ces raisons, la biochimie structurale des protéines membranaires nécessitait leur production en grande quantité.

L'autre méthode permettant de résoudre la structure d'une protéine est la résonance magnétique nucléaire (RMN) mais elle requiert une quantité importante de protéine et est limitée aux objets de faible masse moléculaire. Les protéines membranaires sont généralement des complexes assez gros rendant donc la RMN peu avantageuse pour résoudre leur structure. A noter que la RMN du solide permet de s'affranchir des limites de taille, mais est toujours en développement et est loin de permettre de résoudre des structures.

Désormais, l'utilisation de la cryo-EM permet de s'affranchir de la production de cristaux et change la façon d'appréhender la biochimie structurale des protéines membranaires. Par ailleurs, des informations supplémentaires comme les modifications post-traductionnelles ou la flexibilité sont maintenant observables. Les progrès remarquables de ces dernières années réalisés au niveau du microscope et des algorithmes de traitement des données permettent en outre de s'intéresser à la dynamique de la protéine, à son hétérogénéité conformationnelle

et ainsi de profondément améliorer la compréhension de leur mécanisme à l'échelle moléculaire. Ceci vient avec la « resolution revolution » qui est arrivée à partir de 2014 avec l'apparition des détecteurs à détection directe d'électrons (Kühlbrandt 2014). Il reste toutefois des limitations en termes de quantité de matériel nécessaire à leur observation, et les stratégies de surexpression évoquées ci-dessus ne sont pas complètement obsolètes.

Pour revenir à la cristallographie, un exemple permet de mettre en lumière une notion clé de l'étude des protéines membranaires. La première structure d'une protéine membranaire est celle du centre réactionnel photosynthétique, résolue en 1985 par le groupe d'Hartmut Michel (Deisenhofer et al. 1985). A cette époque, il existait déjà des cristaux de bactériorhodopsine, une des premières protéines jamais cristallisée (1976) (Finkelstein 2014). En fait, les cristaux de protéine étaient rares et il existait « presque autant » de cristaux de protéine soluble que membranaire. On aurait pu penser à l'époque que les courbes de création de structure en fonction du temps allaient se superposer. La suite a montré que le nombre de structures de protéines solubles résolues a très vite suivi une courbe exponentielle alors que pour les protéines membranaires il a fallu attendre beaucoup plus longtemps (Figure 2) et chaque structure était un événement mondial reconnu pour sa difficulté. La raison de cette différence réside dans la nature amphipathique des protéines membranaires qui nécessite la création d'outils spécifiques pour leurs études. Il n'est pas possible de retranscrire les outils établis pour les protéines solubles aux protéines membranaires sans les adapter. Une fois ces outils en place, les obstacles peuvent être franchis les uns après les autres. Il y a donc une spécificité d'étude des protéines membranaires qui sera détaillée ci-dessous.

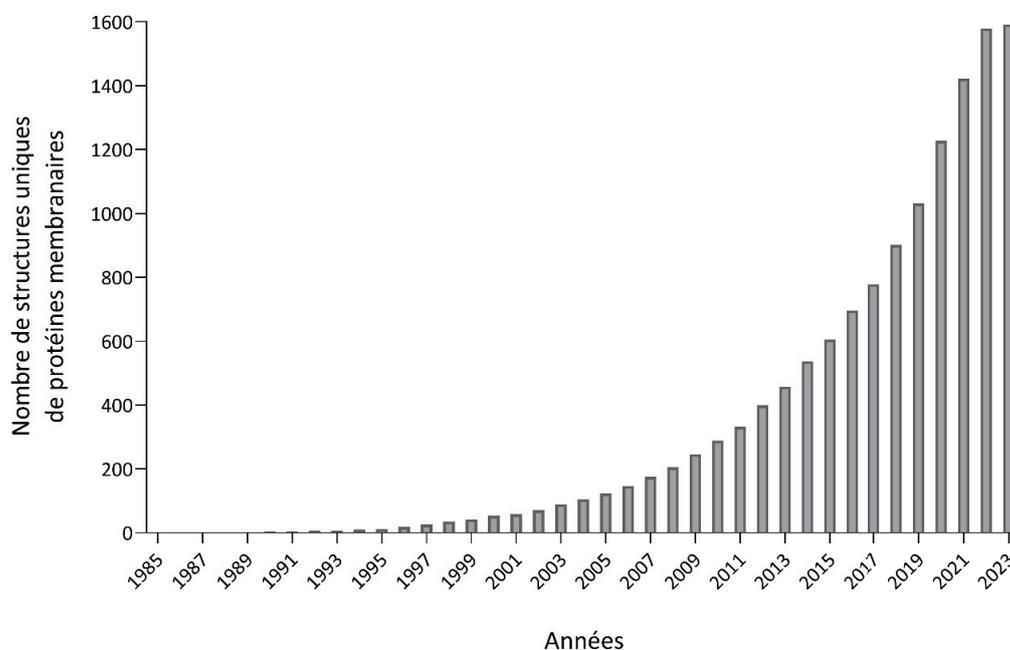


Figure 2 : Evolution du nombre de structures de protéines membranaires  
(D'après <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>)



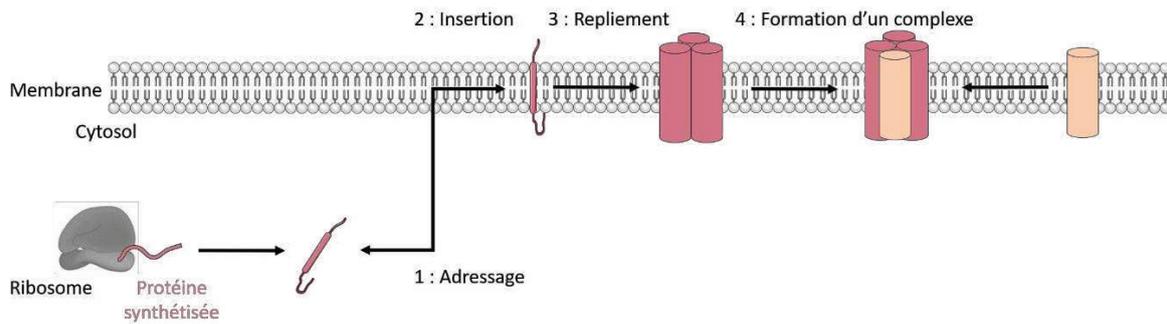
## Partie 1 : Méthodologie pour l'étude des protéines membranaires

Dans cette première partie du manuscrit, je vais développer différentes avancées qui ont permis d'améliorer l'expression des protéines membranaires, la manipulation des détergents et le traitement des données cryo-EM spécifiques aux protéines membranaires. Je présenterai les différentes études que j'ai réalisées de la production à la résolution de la structure. Chaque partie comprend les articles scientifiques auxquels j'ai participé. Un paragraphe regroupant les points majeurs précède chaque publication.

### I. L'expression des protéines membranaires

#### a. La surexpression des protéines membranaires

La première phase de l'étude des protéines membranaires nécessite de les produire au sein d'un organisme hôte afin de les purifier et réaliser des études structurales et fonctionnelles. L'expression des protéines membranaires n'est pas sans difficultés. Autrefois, l'étude des protéines membranaires était possible uniquement lorsque leurs abondances naturelles étaient suffisantes. Puis, la découverte du clonage et autres techniques de biologie moléculaire ont rendu leur analyse plus facile. Par exemple, la fusion des protéines à une étiquette permettant leur purification a grandement aidé les biochimistes (Hochuli 1990). Le passage par un système de surexpression est quasiment obligatoire. Mais, comment procède la cellule pour produire une protéine membranaire, l'adresser et l'insérer à la membrane ? Une protéine membranaire ne peut pas être exprimée comme une protéine soluble puisqu'elle implique par exemple une machinerie supplémentaire pour son insertion dans la membrane qui peut se retrouver surchargée (Grisshammer 2006). Tout d'abord, après sa traduction grâce au ribosome, chez les eucaryotes, la protéine est dirigée vers le réticulum endoplasmique au sein duquel elle sera intégrée à la membrane. Puis la formation de vésicules lipidiques comprenant la protéine permet de l'amener à la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi. Au sein de ce dernier, elle pourra subir des modifications post-traductionnelles. Chez les organismes procaryotes, ce schéma est simplifié puisque ces organelles sont absents. La protéine membranaire synthétisée est directement adressée puis insérée dans la membrane plasmique. Elle est ensuite repliée et forme un complexe si nécessaire. La Figure 3 schématise grossièrement les étapes de la biosynthèse des protéines membranaires formées par des hélices- $\alpha$ . Les protéines membranaires peuvent également former des feuillets- $\beta$  et sont majoritairement retrouvées dans la membrane externe des bactéries Gram négatif ; je ne rentrerai pas dans les spécificités de leur insertion dans la membrane externe.



*Figure 3 : Vue d'ensemble des grandes étapes de la biosynthèse d'une protéine membranaire*  
(Adapté de Hegde et Keenan 2022)

Je vais concentrer mes propos sur le système de translocation bactérien puisqu'il s'agit de l'organisme avec lequel j'ai travaillé pendant ma thèse. Il est composé de plusieurs protéines : le translocon SecYEG, hétérotrimère qui s'assemble pour former un canal et une ATPase associée nommée SecA qui fonctionne comme un moteur moléculaire (Akimaru et al. 1991) (Nishiyama, Hanada, et Tokuda 1994). D'autres protéines accessoires s'ajoutent à ce complexe translocase, SecDFyajC dont les rôles exactes restent à découvrir et l'insertase YidC qui est essentielle à l'insertion de la protéine dans la membrane (Nouwen et Driessen 2002). Le récepteur FtsY intervient également ; il est capable d'interagir avec la membrane et la translocase SecYEG. L'ensemble du processus de translocation est illustré sur la Figure 4.

Les protéines à adresser à la membrane possèdent une séquence signal constituée de quelques résidus ou bien du premier segment transmembranaire qui est reconnu par les Signal Recognition Particle (SRP), un complexe ribonucléoprotéique (Valent et al. 1997). Ce signal est ensuite reconnu par le récepteur FtsY présent à la membrane. Puis, après libération de la SRP, la protéine néosynthétisée est prise en charge par la translocase SecYEG. Les hydrolyses successives de l'ATP par SecA conduisent la protéine le long du canal.

Une étude sur LacY utilisant deux anticorps monoclonaux qui reconnaissent des régions conformationnelles de la protéine a montré que YidC intervient dans le repliement des protéines membranaires (Nagamori, Smirnova, et Kaback 2004). Cette étape est assistée par des chaperonnes comme par exemple DnaK.

Des contrôles qualité surviennent tout au long du processus de biosynthèse de la protéine. Lorsque la protéine est mal repliée il semblerait que YidC cède la protéine à la protéase FtsH pour qu'elle soit dégradée (van Bloois et al. 2008). Dans le cas d'une agrégation dans le cytoplasme, la protéine à dégrader est reconnue par des protéases cytoplasmiques comme Lon ou ClpQ (Bernstein et Hyndman 2001).

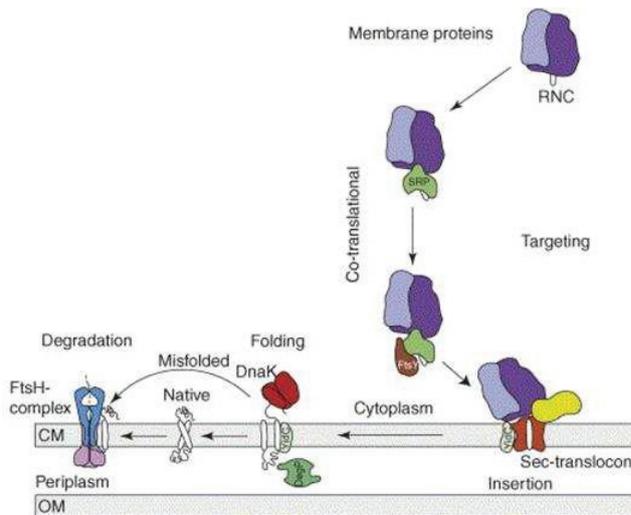


Figure 4 : Schéma de la biosynthèse des protéines membranaires chez les bactéries

RNC : ribosome-membrane protein complex

(D'après Wagner et al. 2006)

Toutefois, le mécanisme de biosynthèse des protéines membranaires est complexe et dynamique et de nombreuses questions restent encore en suspens.

Un autre aspect à prendre en compte lors de l'expression d'une protéine membranaire est sa compatibilité avec l'organisme hôte. Tout d'abord, l'hôte naturel possède les lipides nécessaires à la stabilité et la fonctionnalité de la protéine (Opekarová et Tanner 2003). De fait, des différences dans la propriété de la membrane peuvent influencer sur l'insertion et le repliement de la protéine. Par exemple, l'expression du récepteur humain de la sérotonine n'est pas réalisable dans un hôte bactérien puisque la présence du cholestérol lui est nécessaire pour être fonctionnel (Tate 2001). Il a aussi été montré que la phosphatidyléthanolamine était requise pour obtenir une topologie correcte de la lactose perméase, LacY, au sein de la membrane (Bogdanov, Heacock, et Dowhan 2002). Une étude sur la reconstitution de la glycoprotéine-P a montré que son activité ATPasique et sa capacité à lier des substrats transportés dépendent de la composition en lipides du système (Romsicki et Sharom 1999). Les auteurs ont établi que l'affinité de la vinblastine, daunorubicine et vérapamil est meilleure en dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) qu'en phosphatidylsérine (PS – lipide chargé négativement), phosphatidyléthanolamine (PE), dimyristoyl-PC (DMPC - C14) ou dipalmitoyl-PC (DPPC – C16). La partition de la molécule dans la membrane joue sur la capacité de la protéine à interagir et transporter le substrat. Ces trois exemples témoignent de la complexité d'expression d'une protéine membranaire fonctionnelle et de l'importance du type de lipides présent dans l'environnement lipidique.

D'autres facteurs sont à prendre en compte pour produire une protéine membranaire. La membrane est un environnement complexe à l'intérieur duquel l'espace libre est restreint. De façon physiologique, l'encombrement spatial de la membrane est déjà élevé et trouver de la place pour insérer une protéine surproduite crée donc une complication supplémentaire. De plus, la membrane possède un rapport lipides/protéines optimal et une variation de celui-ci induite par l'insertion massive de protéine peut altérer la structure de la membrane et affecter l'intégrité de la cellule. Pour s'en protéger, cette dernière peut induire une réponse au stress et dégrader les protéines. De plus, cet encombrement peut engendrer la création de corps d'inclusions dans lesquels le polypeptide produit est stocké mais sans repliement correct.

En 2000, une étude a été menée sur l'expression de la sous-unité b de l'ATP synthase  $F_1F_0$  qui possède un segment membranaire N-terminal (Arechaga et al. 2000). Comme illustré dans la Figure 5 ci-dessous, les auteurs ont montré que la surexpression de cette sous-unité dans des souches d'*E. coli* C41(DE3) et C43(DE3) induit la création de membranes intracellulaires avec un rapport lipide/protéine qui reste constant suggérant qu'il y a une augmentation de la synthèse des phospholipides.

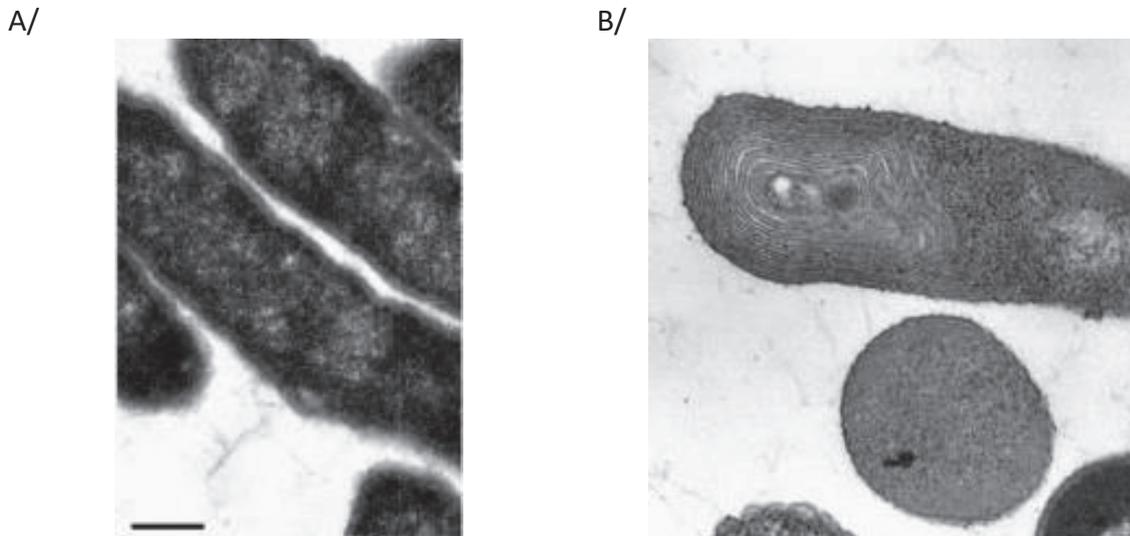


Figure 5 : Clichés de microscopie électronique d'*E. coli* C41(DE3) surexprimant la sous-unité b de l'ATP synthase  $F_1F_0$ .

A/ Bactéries contenant le plasmide sans insert et cultivées pendant 4 h après induction à 37 °C.

B/ Bactéries dont l'expression de la sous-unité b a été induite pendant 18 h à 25 °C.

(D'après Arechaga et al. 2000)

Afin d'essayer de contourner les différents problèmes d'expression de protéines membranaires, Miroux et Walker ont isolé des souches dérivées d'*E. coli* BL21(DE3) possédant des mutations, au niveau du promoteur *lacUV5* notamment, qui conduisent à une diminution du taux d'expression de la polymérase T7 bactérienne favorisant ainsi la surexpression des protéines membranaires. La réduction de l'activité du promoteur diminue le stress cellulaire permettant ainsi d'augmenter la production de protéines. Les souches C41(DE3) et C43(DE3) sont les plus connues. Dans ces souches, la biomasse est augmentée tout comme la quantité de protéine produite (Miroux et Walker 1996). Depuis, d'autres souches sont apparues pour faciliter l'expression des protéines membranaires, par exemple la souche Lemo21(DE3) dans laquelle l'activité de la polymérase T7 est contrôlée par l'inhibiteur T7 lysozyme dont le promoteur est inducible par le rhamnose (Wagner et al. 2008). On peut aussi noter qu'une expression moins forte peut permettre d'obtenir plus de protéines fonctionnelles.

Par ailleurs, il est également possible de favoriser l'expression de la protéine sans utiliser une souche modifiée. La fusion de la protéine membranaire d'intérêt avec la protéine Mistic « membrane-integrating sequence for translation of inner membrane protein constructs » permet l'adressage de la protéine à la membrane sans passer par la machinerie translocon.

Cette protéine de 13 kDa issue de *B. subtilis* est capable de se replier de façon autonome évitant ainsi de surcharger la machinerie de translocation (Roosild et al. 2005). Dans le même ordre d'idée, la modification des propriétés physico-chimiques de l'extrémité N-terminale d'une protéine membranaire peut jouer sur sa surexpression. En effet, la fusion d'une séquence Asp-Pro en N-terminal d'une protéine d'intérêt peut réduire la toxicité due à l'expression d'une protéine membranaire. Cette méthode a été montrée en utilisant l'expression des domaines transmembranaires E1 et E2 des protéines de l'enveloppe du virus de l'Hépatite C fusionnés à la glutathion S-transférase (GST). Des expériences de microscopie ont révélé que les protéines chimériques étaient regroupées sous forme d'amas dans le cytosol au sein desquels la GST était fonctionnelle. Cette réduction de toxicité est probablement due aux charges négatives de l'aspartate et à la proline qui serait responsable de la formation des agrégats protéo-lipidiques cytosoliques (Montigny et al. 2004).

De même, l'utilisation d'un système de production acellulaire dit « cell-free » présente également des avantages pour les protéines membranaires. Il permet d'obtenir la protéine directement en détergent, évitant les problèmes de translocation à la membrane comme cela peut l'être *in vivo*, et d'extraction de la protéine de la membrane (Schwarz, Dötsch, et Bernhard 2008). En outre, des systèmes cell-free peuvent être générés à partir de différents types cellulaires permettant de rester en situation d'expression homologue (Dondapati et al. 2020).

De façon plus générale, l'hôte choisit doit être compatible avec le type de protéine exprimé. Dans le cas de l'expression d'une protéine eucaryote, des modifications post-traductionnelles peuvent être nécessaires pour l'exercice de sa fonction. Ces modifications peuvent dans certain cas être réalisées *in vitro* si l'hôte choisit est procaryote. Les plus importantes sont les phosphorylations, les N-glycosylations et les palmitoylations. Ces dernières sont réalisées par des acyltransférases et se font en présence de palmitoyl-CoA. Les phosphorylations ont principalement lieu sur des sérine, thréonine et tyrosine grâce à l'action des kinases. L'ajout d'un motif glycosidique sur une protéine se fait, quant à lui, sur les arginine, sérine ou thréonine. La réaction est catalysée par une N-glycosyltransférase qui reconnaît la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr.

L'ensemble de ces éléments induit une toxicité pour la cellule hôte et influe sur la quantité et la qualité de la protéine produite. Comme les protéines membranaires sont les voies de communication entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, l'insertion d'une protéine étrangère à l'organisme hôte peut avoir des effets délétères drastiques et entraîner une toxicité forte pour l'organisme. Il n'est en effet pas rare de ne pas pouvoir exprimer une protéine membranaire car les organismes hôtes ne croissent pas. De plus, avec l'avènement de la cryo-EM, la quantité de protéine requise est un peu diminuée ce qui laisse la possibilité de se rapprocher d'un système plus natif et de s'affranchir de certaines limitations décrites ci-dessus.

## b. Les cavéoles

Découvertes pour la première fois en 1953 (Palade GE 1953), les cavéoles sont des invaginations d'une centaine de nanomètres de la membrane plasmique. Elles bourgeonnent et se détachent de la membrane pour former des vésicules dans le cytoplasme. Quarante ans plus tard, Rothberg *et al.* identifient une petite protéine membranaire de 21 kDa, la cavéoline-1, comme marqueur de ces vésicules (Rothberg et al. 1992). En 1995, une autre équipe a montré que l'expression de la cavéoline-1 canine dans des lymphocytes humains - cellules dans lesquelles les cavéoles sont théoriquement absentes - est suffisante pour conduire à la formation de cavéoles (Fra et al. 1995). Plus tard, Walser *et al.* ont confirmé ces résultats en montrant que chez *E. coli* la surexpression de la cavéoline-1 induit la formation de vésicules, nommées *h-caveolæ* (Walser et al. 2012). Il n'est cependant pas exclu que d'autres facteurs soient requis et il est certain que d'autres composants sont présents au sein des cavéoles. Les cavéoles sont particulièrement abondantes dans la membrane plasmique des cellules humaines, notamment dans les adipocytes, les muscles et l'endothélium. La Figure 6 montre des clichés de microscopie électronique sur lesquels on distingue des cavéoles dans les adipocytes et les fibroblastes.

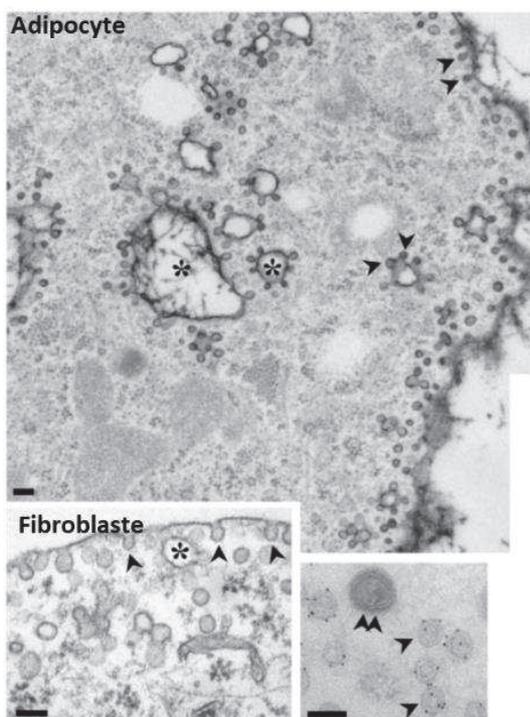


Figure 6 : Clichés de microscopie électronique de différents types cellulaires contenant des cavéoles

Les flèches indiquent des cavéoles et les astérisques des vacuoles. Le cliché en bas à droite correspond à la membrane plasmique d'un adipocyte tagué pour la cavéoline-1. La double flèche indique une vésicule de clathrine.

Barre = 100 nm

(Parton, Hanzal-Bayer, et Hancock 2006)

En 2001, l'inactivation chez la souris du gène codant la cavéoline-1 a révélé l'absence de cavéoles dans le poumon, le tissu adipeux, les reins et le cœur. Cette délétion induit de nombreux dysfonctionnements, en particulier au niveau du système vasculaire (Drab et al. 2001). Les fonctions des cavéoles ne sont pas encore totalement découvertes mais il semblerait qu'elles interviennent dans l'homéostasie des lipides en jouant le rôle de vésicule de transport intracellulaire ou encore dans la signalisation cellulaire comme mécano-senseurs.

L'architecture moléculaire des cavéoles reste peu documentée. Il a été estimé qu'il y aurait environ 200 cavéolines par cavéoles (Pelkmans et Zerial 2005), hypothèse confirmée plus récemment *in silico* (Khater et al. 2018). La structure de la cavéoline-1 a été résolue l'année dernière par cryo-EM par une équipe américaine qui apporte de nouvelles connaissances sur le sujet (Porta et al. 2022) (Figure 7), invalidant une topologie initialement prédite en épingle à cheveux. Un domaine d'oligomérisation permet à la cavéoline de former un complexe de 11 monomères et induire la courbure de la membrane.

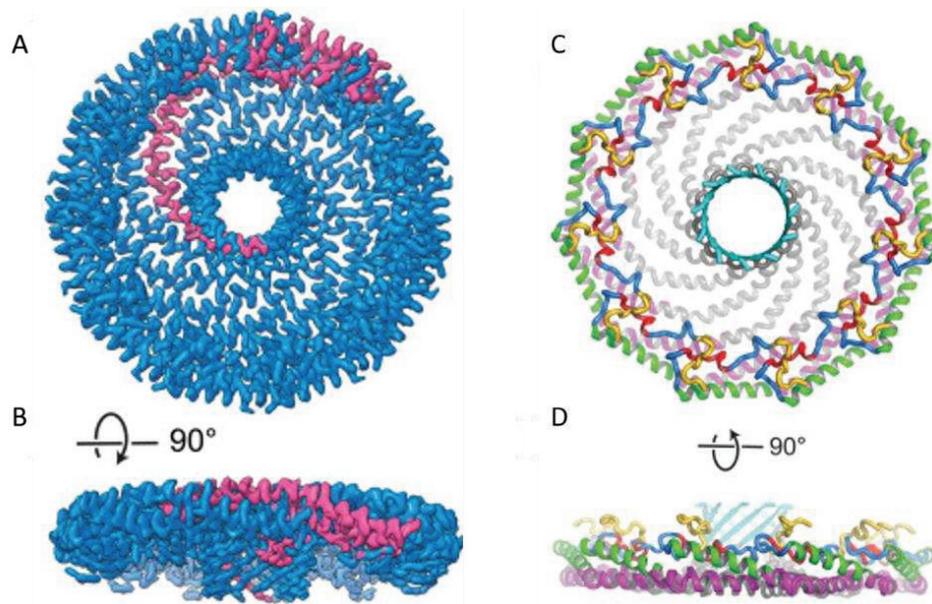


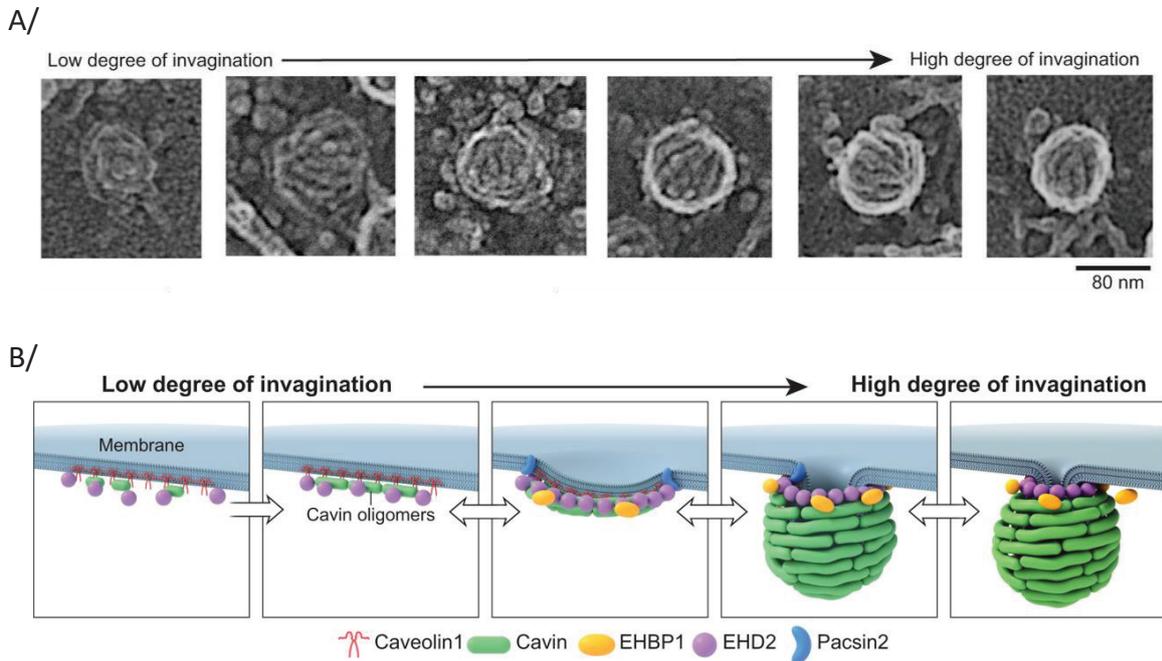
Figure 7 : Structure d'un complexe de cavéoline-1

Structure cryo-EM de la cavéoline-1 à 3,5 Å de résolution (PDB : 7SC0). Les couleurs correspondent aux différentes régions : rouge pour le motif signature, vert pour le domaine d'échafaudage, violet pour le domaine intramembranaire, jaune pour le motif en épingle (pin), gris pour la région en rayons (spoke) et cyan pour le brin  $\beta$ .

Carte de densité de cryo-EM A/vue de dessus B/ vue latérale et le modèle selon les mêmes vues (C/, D/).

(D'après Porta et al. 2022)

Malgré leurs similarités avec les vésicules de clathrine, les cavéoles se différencient au niveau de leur mécanisme de formation ainsi que leur dynamique au sein de la cellule. D'ailleurs, une étude récente s'est intéressée à la relation entre la morphologie des cavéoles et la présence des protéines associées tout au long de la formation de la cavéole (Matthaeus et al. 2022). Des expériences de microscopie électronique et de fluorescence ont permis aux auteurs de proposer un modèle moléculaire de la régulation de la courbure de la cavéole dans les cellules de mammifères (Figure 8).



*Figure 8 : Courbure de la membrane et formation de la cavéole*

A/ Clichés de microscopie électronique (Platinum Replica Microscopy Electronic) acquis à différents stades de formation de la cavéole.

B/ Modèle proposé pour la formation de la cavéole et ses protéines associées.

(D'après Matthaeus et al. 2022)

Même si l'architecture moléculaire et les fonctions des cavéoles ne sont pas encore complètement élucidées, les connaissances actuelles sont suffisantes pour se servir de ces vésicules en tant qu'outil. Par exemple, en modifiant génétiquement la cavéoline il est envisageable d'utiliser les cavéoles comme moyen de véhiculer un traitement en ciblant spécifiquement une cellule (Schnitzer 2001) (Rewatkar et al. 2015). Une étude a été réalisée sur du tissu pulmonaire et a montré qu'un anticorps, le TX3.333, pouvait cibler et pénétrer dans la cavéole. Cette voie d'entrée permet d'éviter la barrière endothéliale, obstacle majeur dans l'élaboration d'un composé thérapeutique (McIntosh et al. 2002).

Au-delà de la capacité des cavéoles à créer des vésicules cytoplasmiques et de la membrane supplémentaire, elles peuvent être utilisées à des fins biotechnologiques. Une équipe coréenne a utilisé la capacité des cavéolines à induire la formation de cavéoles pour l'import de molécules hydrophobes dans la cellule afin de les biotransformer (Shin et al. 2019).

### c. Surexpression de BmrA dans des cavéoles

Les cavéolines ont également été utilisées pour médier la surproduction de protéines membranaires dans le but d'éviter les différents obstacles présentés plus haut. Dans une étude menée par une équipe coréenne en 2015, la coexpression fonctionnelle, dans des cavéoles, des protéines membranaires SNARE, la syntaxine-1a, et VAMP2, la vesicle-associated membrane protein 2 a été réalisée. Les auteurs ont également montré que des

substrats, ajoutés dans le milieu de culture dans lequel était cultivé *E. coli* surexprimant la cavéoline-1, s'étaient retrouvés dans la cellule par endocytose (Shin et al. 2015).

Dans ce contexte, j'ai participé au projet ANR CAVEOTANK porté par Nadège Jamin (CEA Saclay) dans lequel l'équipe était partenaire et dont l'objectif était de tester l'expression de cavéoline dans la bactérie *E. coli* et sa coexpression avec une protéine membranaire, ici BmrA. Le but était d'évaluer ce système pour l'utiliser comme réservoir de membrane enrichies en protéines membranaires et également d'isoler des fragments de membranes enrichies en protéine d'intérêt et déjà pré-formés en vésicules.

J'ai débuté cette étude durant mon stage de Master 2 et l'ai finalisé au début de ma thèse. Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article ci-dessous. Avant d'en résumer les données essentielles, je vais expliquer certaines notions en permettant une meilleure compréhension. L'article en question correspond à un protocole visant à enrichir des cavéoles en protéine membranaire, ici BmrA. J'ai utilisé le colorant Hoechst33342 que BmrA transporte et dont on peut suivre l'accumulation par fluorescence et j'ai aussi mesuré l'activité ATPasique de BmrA comme marqueur fonctionnel. En effet, BmrA comme les protéines de la même famille, est composée de 4 domaines, 2 membranaires (TMD) contenant le site de fixation des substrats et 2 cytoplasmiques, liant et hydrolysant l'ATP (NBD). La Figure 9 schématise le fonctionnement de ces transporteurs. A noter qu'une description de BmrA sera détaillée dans la 2<sup>ème</sup> partie.

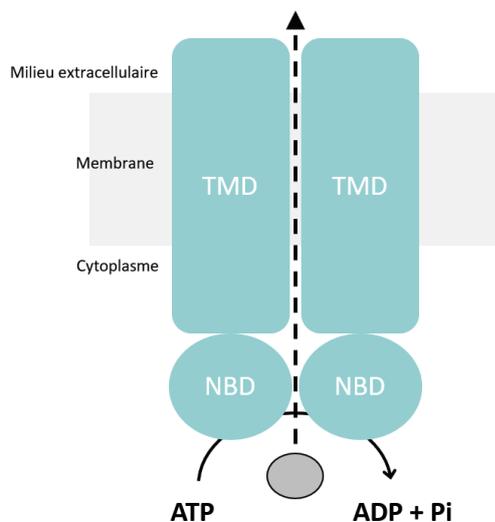


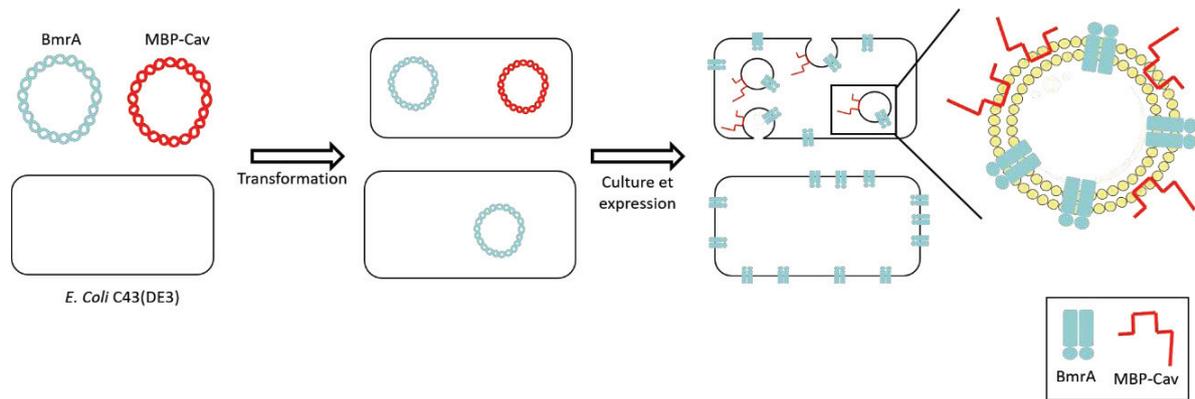
Figure 9 : Mécanisme général de fonctionnement des exportateurs ABC

TMD : domaine transmembranaire  
NBD : domaine de fixation des nucléotides

Cercle gris : substrat

Tout au long de l'étude, j'ai comparé l'expression de BmrA avec et sans celle de la cavéoline 1 $\beta$ . La Figure 10 ci-dessous illustre les différences entre ces 2 systèmes d'expression utilisés.

Figure 5



*Figure 10 : Surexpression de BmrA en cavéoles chez E. coli*  
 Pour simplifier, la bicouche lipidique est représentée avec un seul trait.

J'ai donc évalué la fonctionnalité de BmrA en mesurant son activité ATPasique et celle de transport de Hoechst33342. Cette dernière est suivie par le changement de fluorescence du colorant qui est modulée par son environnement, élevée en milieu hydrophobe et faible en milieu aqueux. L'addition du colorant à une suspension membranaire (tracé noir dans la Figure 11B) se traduit par une augmentation de sa fluorescence correspondant à l'accumulation de Hoechst33342 dans la bicouche lipidique (tracé vert) schématisé dans le panneau A. La fluorescence du colorant diminue alors lentement, témoignant une fuite vers le milieu aqueux. Le transport est initié en ajoutant de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> qui est aussitôt hydrolysé par BmrA et qui se traduit par une baisse plus rapide de la fluorescence du colorant, cette fois activement expulsé dans le milieu aqueux (tracé rouge). Ce dernier contient dès le départ de la pyruvate kinase et du phosphoénolpyruvate qui permettent de phosphoryler l'ADP produit et ainsi maintenir constante la concentration d'ATP. En fin de réaction, la fluorescence du colorant se stabilise à un niveau d'équilibre entre réinsertion du colorant dans la membrane et départ de celle-ci.

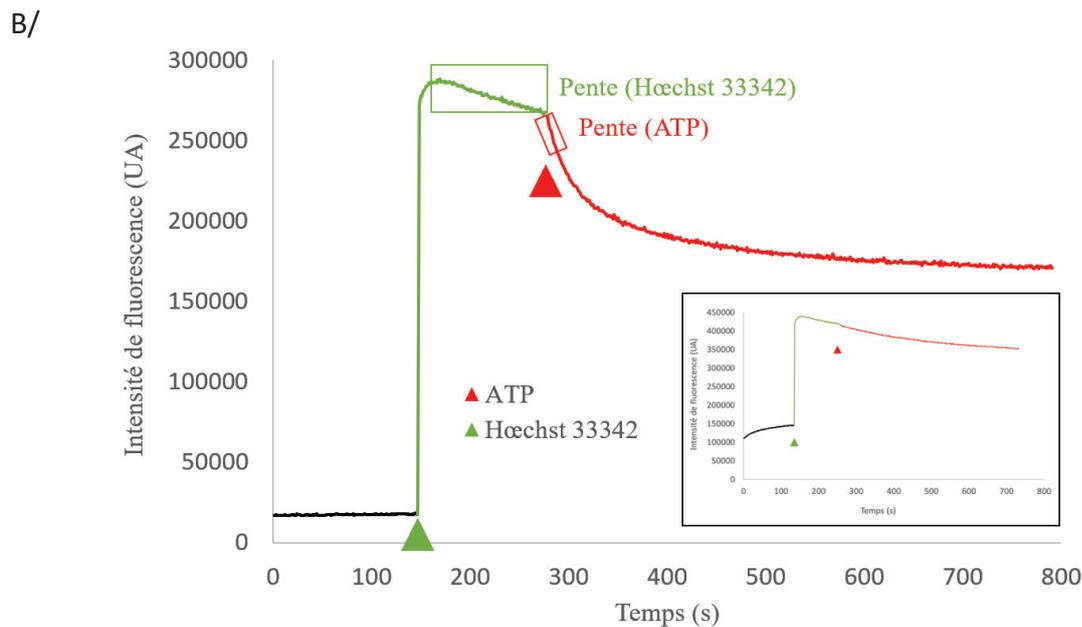
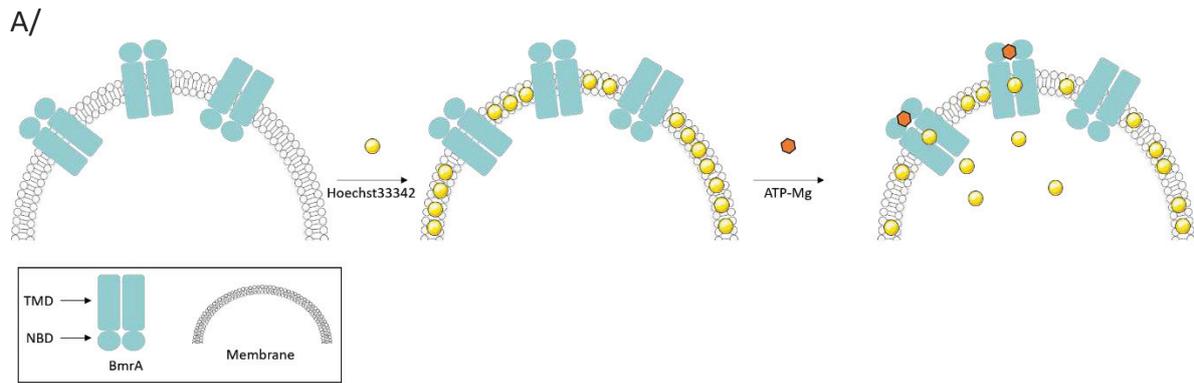


Figure 11 : Mesure de l'activité de transport du Hoescht33342 par BmrA

A/ Schéma de principe du transport du Hoescht33342 par BmrA.

B/ Tracé type obtenu avec BmrA naturel et rendu incapable, par mutation, d'hydrolyser l'ATP (encart). La flèche verte correspond à l'ajout du Hoescht33342 et la rouge à celui de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>.

Durant cette étude j'ai tout d'abord coexprimé, dans *E. coli*, la cavéoline-1 $\beta$  canine et BmrA dont les gènes respectifs sont insérés dans deux vecteurs différents. Un gradient de saccharose m'a permis d'isoler les fractions membranaires enrichies en cavéoline et BmrA, repérées par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie et alternativement par Western-blot. La comparaison de l'expression de BmrA dans chacune des fractions du gradient a révélé qu'en présence de cavéoline le transporteur est produit plus faiblement qu'en absence de celle-ci. De façon intéressante, l'activité ATPasique spécifique de BmrA co-exprimée avec la cavéoline est supérieure à celle de BmrA exprimée seule. De même, l'activité de transport du Hoescht33342 est également augmentée en présence de la cavéoline. La coexpression semble donc contribuer à générer une population de BmrA plus fonctionnelle ou tout du moins orientée de manière à mesurer une activité plus forte lorsqu'elle est dans ce compartiment. L'expression de BmrA en cavéoles permettrait donc une orientation préférentielle des NBDs à l'extérieur des vésicules, là où est l'ATP, comme illustré dans la

Figure 12. Lors du fractionnement des bactéries, en absence de cavéoles, les vésicules membranaires qui se forment exposent de manière aléatoire les NBDs de BmrA, statistiquement autant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la vésicule. Par contre, en présence de cavéoles, le transporteur qui y est inséré expose ses NBDs à l'extérieur de la vésicule. (Figure 12).

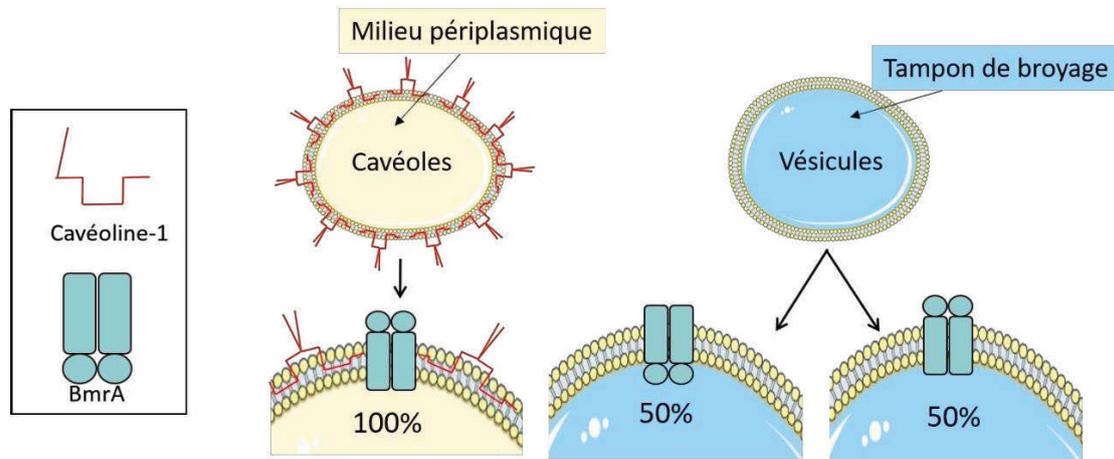


Figure 12 : Représentation schématique des différentes vésicules formées

Malheureusement, ce projet n'est pas allé au-delà de ces expériences prometteuses bien que l'étude de la protéine dans son milieu natif offre un réel avantage. L'échantillon n'étant pas constitué uniquement de la protéine d'intérêt, de nombreuses expériences contrôles seraient nécessaires afin de s'assurer que l'ensemble des observations faites soient dues à la présence des cavéoles. Dans l'article méthodologique ci-dessous pour lequel je suis 1<sup>ère</sup> auteure, il faudrait réaliser une optimisation de la production et de la séparation des cavéoles par gradient de saccharose.

De plus, des expériences complémentaires étayant ces données préliminaires seraient à envisager. Des observations par microscopie permettraient de visualiser les cavéoles au sein desquelles BmrA et la cavéoline-1 sont coexprimées afin de comparer l'homogénéité de chacun des échantillons.

L'expression en cavéoles présente de nombreux avantages. Ces objets peuvent être séparés du reste de la membrane par gradient de saccharose permettant de les étudier séparément. Aussi, BmrA se trouve dans un environnement natif et cela représente un réel atout puisqu'il pourrait par exemple permettre d'étudier le transporteur *in-situ* par cryo-tomographie. Ce système demande encore plusieurs optimisations mais il semble applicable à l'étude d'autres protéines membranaires et permettrait par exemple de tester le pouvoir inhibiteur de certaines molécules sur la protéine d'intérêt.

- d. Publication 1 : Overexpression of the ABC transporter BmrA within intracellular caveolæ in *Escherichia coli*



## Overexpression of the ABC Transporter BmrA Within Intracellular Caveolae in *Escherichia coli*

Alexia Gobet, Christine Jaxel, Sandrine Magnard, Manuel Garrigos, Stéphane Orlowski, Nadège Jamin , Pierre Falson , and Vincent Chaptal 

### Abstract

We describe here the overproduction and oriented membrane insertion of membrane protein inside intracellular vesicles named heterologous caveolae within *E. coli*. The method is described with BmrA, a multidrug efflux pump from *Bacillus subtilis*. BmrA is produced in these vesicles, thanks to the coexpression with the canine caveolin-1 $\beta$ , one of the two isoforms of caveolin-1. Enriched by sucrose gradient, the caveolae-containing fraction allows to probe the ATPase and Hoechst 33342 transport activities, the latter displaying a higher specific activity than the same without caveolin-1 $\beta$ .

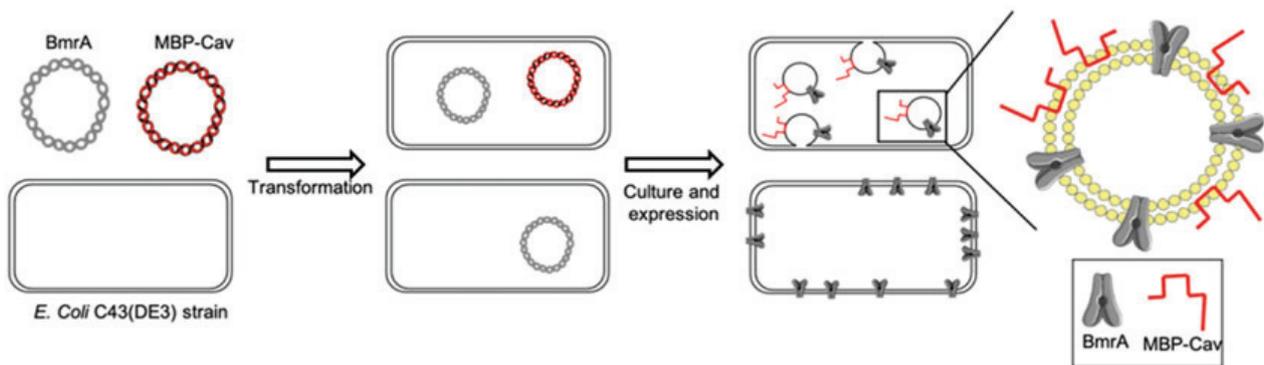
**Key words** ABC transporter, Membrane protein overexpression, Membrane caveolae, Cytoplasmic vesicles

---

### 1 Introduction

Membrane proteins are key drug targets that drive many researches on these objects [1]. Overexpression is thus often used to obtain the large quantity of proteins required and achieve adequate purity and homogeneity levels. For membrane proteins, this overexpression has often been a major bottleneck. Indeed, overexpression can be toxic to cells, frequently requiring a mild overexpression rather than a massive production, and the quality of the produced protein requires meticulous and rigorous testing. Some documented examples show that a gentler expression of membrane proteins often results in a protein more active than the same protein produced in a larger quantity [2].

The orientation of the membrane protein can also be a critical point for their function, a problem especially concerning multidrug efflux pumps which translocate drugs from cytosol to the extracellular space. Membrane caveolae are submicroscopic pits of the



**Fig. 1** Schematic view of BmrA expression alone or with caveolin-1. *E. coli* C43(DE3) strain is transformed with a plasmid carrying BmrA, alone (bottom), or cotransformed with the same plasmid plus a plasmid coding for MBP-cav1 (top). After expression, BmrA expressed alone goes to the plasma membrane, while when being overexpressed with MBP-cav1 BmrA goes into intracellular caveolae. A zoom of a schematic caveolae is depicted on the right. BmrA is a transmembrane protein, caveolin is a monotopic membrane protein with a hydrophobic helix–turn–helix motif flanked by amphipathic helices with both N- and C-termini being cytoplasmic. Adapted from [6]

membrane found in higher eukaryotes [3]. These 60–80 nm wide pits are distinct from typical membrane invagination, being formed by the recruitment of a specific caveolin-1 protein and showing features distinct from clathrin-coated pits. Caveolae are cell-type specific with cells being devoid of them (Kidney), or at the opposite can represent 50% of the plasma membrane surface for endothelial cells or adipocytes [3, 4]. Recently, heterologous caveolae have been successfully described in *E. coli* by heterologous expression of human caveolin-1 [5], opening the way to their use as membrane protein overexpression, being a reservoir for cell membrane [6]. Membrane caveolae are made from the plasma membrane, which imposes the orientation of the expressed protein exposing the intracellular region of the protein to the cytosol once the caveolae is generated.

The *Bacillus subtilis* ABC transporter BmrA is a multidrug transporter recognizing and transporting many structurally unrelated drugs [7–9]. Its overexpression confers resistance to *B. subtilis* against cervimycin C, an antibiotic secreted by a biotope competitor [10]. Here, we report the functional overexpression of BmrA within heterologous caveolae in *E. coli* (Fig. 1) allowing to probe the transport of drugs.

## 2 Materials

### 2.1 Plasmids

1. The gene coding for BmrA WT and BmrA E504A are inserted in the pET-15b vector (Invitrogen) bearing ampicillin resistance.

2. The gene coding for the fusion protein Maltose-Binding Protein-caveolin-1 $\beta$  (MBP-Cav) is inserted into the pETM-40 vector (EMBL). The periplasm addressing sequence of MBP has been removed. The plasmid bears kanamycin resistance.

Both proteins carry an N-terminal 6xHis tag.

## 2.2 Lab Equipments

1. Class-II biological safety cabinet for sterile experiments.
2. Petri dishes.
3. 4  $\times$  5 L glass Erlenmeyer for bacterial culture.
4. New Brunswick™ Innova® 44 incubator, temperature regulated.
5. Low-speed centrifuge for 15/50 mL Falcon-type tubes.
6. Cell disrupter: Cell-D Constant Systems Ltd. for bacterial lysis.
7. SDS-PAGE: Mini PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad) and related devices, 0.75 mm spacer plate, 10 or 15-wells comb.
8. 96-wells plates.
9. Xenius SAFAS spectrophotometer for ATPase activity and substrate transport measure.
10. 1 mL Quartz cuvette.

## 2.3 SDS-PAGE

1. Acrylamide 4 $\times$ /bis-acrylamide: 40%, 37.5:1.
2. Loading buffer Laemmli (4 $\times$ ): 8% (v/v) SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.025% (w/v) bromophenol blue, 2.8 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 40% (v/v) glycerol.
3. Separating buffer stock solution: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8.
4. Stacking buffer stock solution: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8.
5. Aqueous SDS solution, 10% (w/v).
6. Ammonium persulfate aqueous (APS) solution 10% (w/v), kept at  $-20$  °C.
7. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED).
8. Running buffer stock solution: Tris-Glycine-SDS (TG-SDS) 10 $\times$ .
9. Prestained molecular weight marker (10–170 kDa).
10. Staining solution: Coomassie buffer: 0.025% (w/v) Coomassie blue R250, 1% (v/v) ethanol, 25% (v/v) isopropanol, 10% (v/v) acetic acid.
11. Destaining solution: 10% (v/v) acetic acid.

## 2.4 Cells and Media for Cell Culture

1. Bacteria: *E. coli* C43(DE3) strain.
2. SOC medium: 2% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, and 20 mM glucose.

3. Antibiotics stock solution: 40 mg/mL kanamycin and 50 mg/mL ampicillin resuspended in dH<sub>2</sub>O. Kept at -20 °C.
4. LB media: 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl. The powder is dissolved in deionized water (making a total weight of 25 g/L) and sterilized by autoclaving 20 min at 121 °C. Right before use, the medium is supplemented with antibiotics: ampicillin 50 µg/mL for BmrA expression and kanamycin 40 µg/mL when caveolin is expressed.
5. LB-agar media: LB media supplemented with 15 g/L agar and antibiotic(s).
6. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 M stock solution.

### **2.5 Membrane Preparation and Sucrose Gradient**

1. Bacterial lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA and benzonase.
2. Membrane washing buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, anti-protease.
3. Glass homogenizer (50 mL Dounce).
4. Sucrose: stock solution of 60% (w/v) sucrose used to prepare dilution to final concentrations of 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, and 55% (v/v) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl.
5. BCA assay: 1 mg/mL bovin serum albumin and Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
6. Centrifuge with 15/50 mL tubes rotor and ultracentrifuge (Optima XPN-80, Beckman-coulter) with 50.2 Ti and SW41 Ti rotor.

### **2.6 ATPase Activity**

1. Inhibitors: 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 2 mM Na<sub>2</sub>S, 5 mM NaN<sub>3</sub>.
2. ATPase activity assay buffer: 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL pyruvate kinase (PK, Sigma-Aldrich), 0.1 mg/mL lactate dehydrogenase (LDH, Sigma-Aldrich), 1 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 5 mM ATP-Mg (final concentration from a 100 mM mix made of 200 mM ATP + 200 mM MgCl<sub>2</sub> added in equal parts), 0.6 mM NADH.

### **2.7 Hoechst 33342 Transport Assays**

1. Transport buffer: 50 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.5 mM NaCl.
2. ATP stock solution: 200 mM.
3. Hoechst 33342 stock solution: 200 µM.

### 3 Methods

#### 3.1 *E. coli* Cotransformation with Genes Coding for BmrA and MBP-Cav1 $\beta$

To generate heterologous caveolæ and to have BmrA inserted into them, MPB-Cav1 $\beta$  and BmrA are overexpressed simultaneously. This is achieved by having the two plasmids at the same time within *E. coli* cells by cotransformation and selection using two different antibiotics.

1. Fifty nanograms of each supercoiled circular plasmid *pET15b-bmra* [9] and *pETM40-mbp cav* [11] are added to 100  $\mu$ L C43 (DE3) *E. coli* competent cells, for 30 min on ice.
2. Heat-shock at 42 °C for 30 s, then place back on ice.
3. Add 300  $\mu$ L SOC medium under biological safety cabinet and incubate 1 h at 37 °C under agitation.
4. Spread 50  $\mu$ L of the cell mix onto LB-agar medium supplemented by ampicillin and kanamycin (*see Note 1*).
5. Incubate overnight at 37 °C, upside-down.
6. Controls for downstream experiments are achieved by cotransformation of mutant BmrA E504A (inactive) with *pETM40-mbp cav* to compare to the WT protein. Controls of BmrA transformed alone, without the plasmid coding for MBP-Cav, are also performed to compare expression and activity levels.

#### 3.2 Culture and Overexpression

1. A freshly transformed colony is transferred into 20 mL LB-medium (in a 100 mL flask) supplemented with adequate antibiotics.
2. Incubate this preculture overnight at 37 °C under agitation (180 rpm).
3. Inoculate 4  $\times$  500 mL of LB medium (with adequate antibiotics) in 5 L Erlenmeyer to a final OD<sub>600</sub> of 0.1 with the overnight preculture.
4. Incubate at 37 °C under agitation until OD<sub>600</sub> reaches 0.6 and induce expression with 0.5 mM IPTG. Incubate overnight at 22 °C under agitation.
5. Centrifuge cultures at 5000  $\times$  g, 4 °C for 15 min with JLA 9.1000 rotor to collect bacteria.
6. With spatula, transfer the pellet in 50 mL-tube, suspend them in 40 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl to wash bacteria. Centrifuge again as previously and discard the supernatant.
7. If cell lysis is not performed immediately, store pellets at -80 °C.

### 3.3 Membrane Preparation

1. Resuspend bacteria in 50 mL per 2-L of culture with lysis buffer. From this point, keep everything at 4 °C or on ice.
2. Lyse cells with a cell disrupter such as Cell-D Constant Systems Ltd. with one pass at 1.4 kbar. If others cell disrupters are used, refer to the manufacturer's guidelines in order to keep vesicles intact (*see Note 2*).
3. Centrifuge cell lysate at  $5000 \times g$ , 15 min, 4 °C to pellet cell debris and intact cells. Collect supernatant and discard pellets.
4. Centrifuge supernatants at  $100,000 \times g$ , 1 h, 4 °C using 50.2 Ti rotor and suspend pellet with 1 mL of membrane washing buffer. Use a glass homogenizer and pestle to homogenize.

Take a 10  $\mu$ L aliquot to determine protein concentration in membranes using a BCA assay (following manufacturer's procedures, PIERCE) with an approximate 20-fold dilution of the membranes.

5. Homogenized membranes can be stored in cryo-tubes and frozen in liquid nitrogen until further use.

### 3.4 Probe BmrA Expression on SDS-PAGE, Quantify Expression Using Prepurified Protein

1. Prepare a 10% separating gel by mixing 9.6 mL of water, 5 mL of 40% acrylamide–bisacrylamide solution, 5 mL of 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 200  $\mu$ L of 10% SDS, 200  $\mu$ L of 10% APS (*see Note 3*), and 20  $\mu$ L of TEMED. Pour it between two glass plates and add water at the surface of the gel to ensure a flat surface. Let polymerize and prepare a 4% stacking gel: 3.1 mL of water, 550  $\mu$ L of 40% acrylamide/bis-acrylamide solution, 1.3 mL of 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50  $\mu$ L of 10% SDS, 50  $\mu$ L of 10% APS, and 5  $\mu$ L of TEMED.

Remove water on separating gel and add stacking gel, place a 15-well comb and let polymerize.

2. Pipet 10  $\mu$ g of total protein, add water to a final volume of 10  $\mu$ L and add 3  $\mu$ L of 4 $\times$  loading buffer.
3. Load 12  $\mu$ L sample and run 10 min at 90 V then 1.5 h at 120 V.
4. Add known amount of purified BmrA [9] on the gel for comparison. For pure protein, incubate only 5 min with loading buffer to minimize aggregating artifacts on the gel.
5. After electrophoresis, incubate gel in staining solution for 30 min and decolorating solution for 1 h.
6. Quantify the intensity of bands corresponding to BmrA by densitometry, using for example ImageJ software.

### 3.5 ATPase Activity

For each type of membranes, two tubes are prepared, with vanadate ( $\text{VO}_4^-$ ) and without  $\text{VO}_4^-$ .

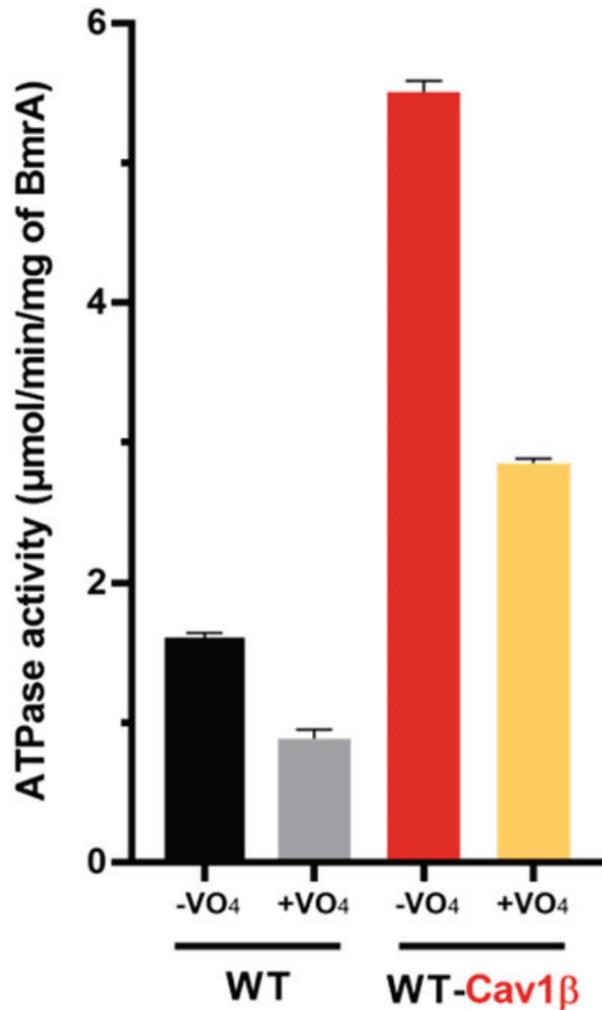
Reaction buffer	Reaction mix	– VO <sub>4</sub> <sup>–</sup> mix	+ VO <sub>4</sub> <sup>–</sup> mix
30 mM Tris-HCl pH 8.0	5 mM ATP-Mg	5 mM ATP-Mg	5 mM ATP-Mg
100 mM NaCl	5 mM NaN <sub>3</sub>	5 mM NaN <sub>3</sub>	5 mM NaN <sub>3</sub>
10 mM KCl	2 mM Na <sub>2</sub> S	2 mM Na <sub>2</sub> S	2 mM Na <sub>2</sub> S
2 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6 mM NADH	Reaction buffer	1 mM VO <sub>4</sub> <sup>–</sup>
	0.1 mg/mL PK	(final volume	Reaction buffer
	1 mg/mL PEP	of 46 µL per reaction)	(final volume
	0.1 mg/mL LDH		of 46 µl per reaction)
	Reaction buffer		
	(final volume		
	of 180 µL per reaction)		

1. Calculate each necessary volume for “– VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix”, “+ VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix”, “reaction mix”, and each reagent.
2. Prepare Na<sub>2</sub>S and NaN<sub>3</sub> stock solution (they must be prepared just before the experiment and cannot be stored) (*see Note 4*).
3. Incubate VO<sub>4</sub><sup>–</sup> stock solution for 10 min at 95 °C in dry bath before dilution (*see Note 5*).
4. Prepare reaction buffer and ATP-Mg solution.
5. Prepare “– VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix” and “+ VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix”.
6. Place 24 µL of each type of membranes in two different tubes.
7. Add 46 µL of “– VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix” or “+ VO<sub>4</sub><sup>–</sup> mix” to the corresponding tube and incubate for 10 min at 30 °C under shaking.
8. Prepare reaction mix and incubate at 30 °C.
9. For each tube with or without VO<sub>4</sub><sup>–</sup>, dispatch in 3 × 20 µL in a 96-well UV plate.
10. Add 180 µL of reaction mix in each well and read immediately NADH absorbance at 340 nm for 20 min at 30 °C.

Figure 2 shows a typical example of BmrA ATPase activity on membranes. BmrA specific activity is the difference between the total activity, and the vanadate inhibited activity. Overexpression of BmrA in the presence of caveolin-1β increases BmrA specific activity, being the result of fewer amount of BmrA produced but showing better activity. Note that the use of a BmrA inactive mutant is also a good control to differentiate specific activities.

### 3.6 Sucrose Gradient and SDS-PAGE Analysis

1. Prepare 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, and 60% (w/v) sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl.
2. A sucrose gradient is prepared in SW41 rotor tube by pipetting first 1 mL of 60% sucrose solution and placing it at the bottom of the tube. Then, 1 mL of each sucrose concentration are added one after another in decreasing concentration order, by



**Fig. 2** ATPase activity on membranes overexpressing BmrA. Vanadate (VO<sub>4</sub>) is a P-loop ATPase inhibitor. It therefore inhibits BmrA, the difference corresponding to the net ATPase activity of BmrA. The data shows that the coexpression of caveolin-1b increases about four times (0.7 vs 2.6) the ATPase activity VO<sub>4</sub> sensitive of BmrA

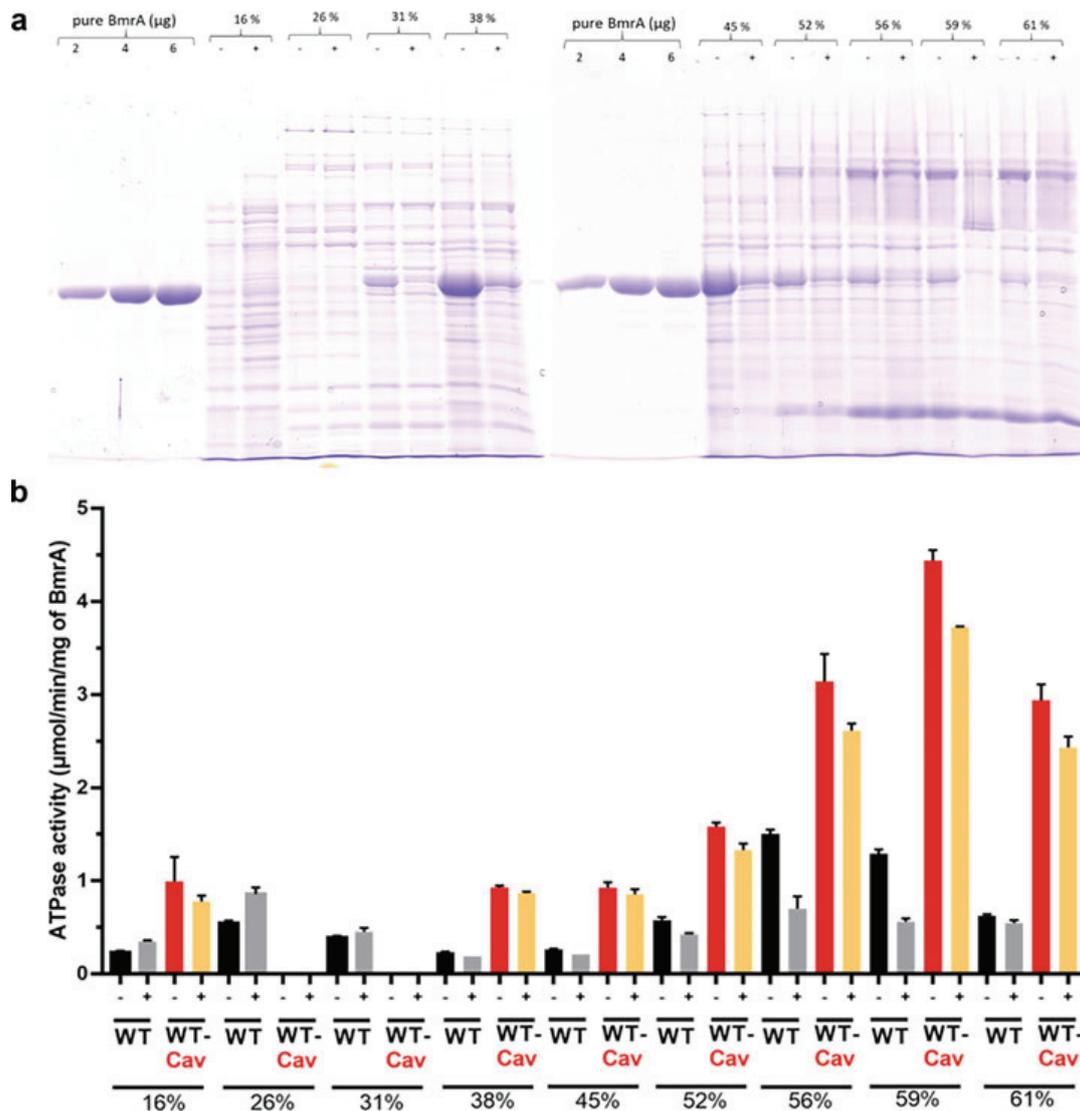
gentle pipetting to minimize disruption of the sucrose layers. At the top, add the volume of membranes corresponding to 10 mg of protein (*see Note 6*).

When adding the sucrose solution, pour the solution slowly against the tube walls to not disturb the sucrose layers.

3. Centrifuge overnight (about 15 h) at  $150,000 \times g$ , 4 °C.
4. Collect 1 mL fraction one by one from top to bottom and keep them in Eppendorf tube. It is a good idea to store each fraction in aliquots of 0.5 mL in liquid nitrogen.

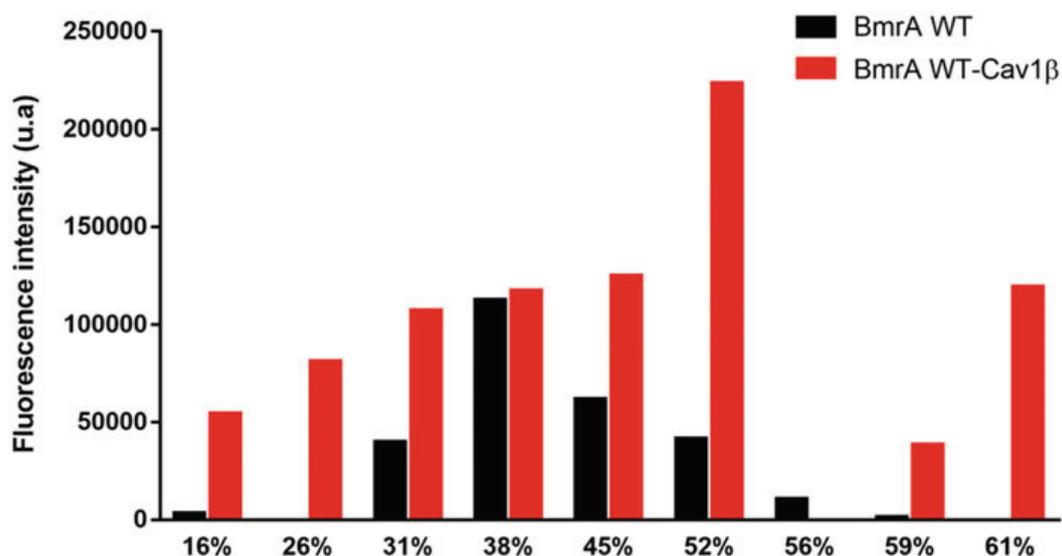
Resuspend the pellet in 1 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl.

5. Analyze fractions of the gradient by SDS-PAGE by mixing 10 µL of sample with loading buffer and incubate 30 min at room temperature before loading on acrylamide/bis-acrylamide gel, as described before.
6. Each fraction can be analyzed for activity as described above.



**Fig. 3 (a)** Coomassie stained SDS-PAGE of the sucrose gradient fractions. Real sucrose percentages are indicated at the top. Purified BmrA is added to quantify the BmrA in each fraction. Note that the range of BmrA quantity varies greatly on the gel, so the quantity of BmrA deposited on it allows to quantify only the intense bands. For smaller intensities, another similar SDS-PAGE is run with smaller quantities of purified BmrA for quantification (not shown here). The SDS-PAGE shows that BmrA is much more produced in absence of caveolin-1b than with it, about five times for the fractions 38 and 52%, discussed in the text. **(b)** Representative ATPase activity from membranes separated on a 20–60% sucrose gradient. The percentage represents real sucrose concentration in the fractions measured by refractometry

Figure 3 shows a representative result of sucrose gradient separation of a membrane fraction. Noticeably, BmrA, overexpression in the presence of caveolin-1 $\beta$  results in a lower amount of BmrA produced, but the ATPase activity is remarkably higher. This is not surprising as it has been observed after changing BmrA overexpression on other *E. coli* cell lines [2].



**Fig. 4** Hoechst 33342 transport activity for fractions of BmrA WT gradient (black) and BmrA WT-Cav1b gradient (red). The graph shows that the cumulated amounts of H33342 transported in fractions 31–56 are of 266,000 and 572,000 without and with caveolin-1b, respectively, so two times higher when caveolin-1b is coexpressed with BmrA. In addition, fraction 52 with caveolin-1b displays the highest transport activity, five times higher than without caveolin-1b. Considering that BmrA is 5 expressed lower than without caveolin-1b (Fig. 3, lane 52), the amplification of transport activity is of about 20, thanks to the caveolin-1b coexpression

### 3.7 Hoechst 33342 Transport Assays (Fig. 4)

The Hoechst 33342 transport (*see Note 7*) is recorded at 25 °C with  $\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{emission}} = 457 \text{ nm}$  and bandwidth of 8 nm.

1. In the quartz cuvette, put membranes corresponding to 50  $\mu\text{g}$  of proteins and complete to 1 mL with transport buffer.
2. One minute later add 10  $\mu\text{L}$  of 200  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342, final  $[\text{Hoechst 33342}] = 2 \mu\text{M}$ .
3. One minute later add 10  $\mu\text{L}$  of 200 mM ATP, final  $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$ .
4. Record fluorescence until equilibrium is reached (Fig. 4).

## 4 Notes

1. Antibiotics should be prepared fresh to a maximal efficiency.
2. Do not disrupt the cells too much to keep vesicles intact.
3. APS is stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and must be thaw just before the experiment.
4.  $\text{NaN}_3$  and  $\text{Na}_2\text{S}$  are toxic and must be prepared under chemical fume hood.
5.  $\text{VO}_4^-$  must be heated to break down aggregates. It can modify absorbance at 340 nm so control with  $\text{VO}_4$  alone is needed.

6. To prevent dilution of gradient and biasing reproducibility, do not add too much protein on the gradient.
7. To avoid parasite transport by others membrane proteins, use doxorubicin as substrate.

## References

1. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993–996
2. Mathieu K et al (2019) Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain. *Sci Rep* 9:2654–2669
3. Parton RG, Del Pozo MA (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:98–112
4. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54:431–467
5. Walser PJ et al (2012) Constitutive formation of caveolae in a bacterium. *Cell* 150:752–763
6. Shin J et al (2015) Display of membrane proteins on the heterologous caveolae carved by caveolin-1 in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Enzym Microb Technol* 79-80:55–62
7. Orelle C et al (2008) Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA. *Biochemistry* 47:2404–2412
8. Steinfels E et al (2004) Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 43:7491–7502
9. Chaptal V, Zampieri V, Wiseman B et al (2021) Drug-bound and -free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter point to a swing mechanism. *bioRxiv* 2021.03.12.435132
10. Krugel H et al (2010) Cervimycin C resistance in *Bacillus subtilis* is due to a promoter up-mutation and increased mRNA stability of the constitutive ABC-transporter gene *bmrA*. *FEMS Microbiol Lett* 313:155–163
11. Perrot N (2015) Production dans *Escherichia coli* de vésicules enrichies en cavéoline-1 (32-178) canine ou son fragment (76-178) [Thèse de doctorat]. *Theses.fr*. <http://www.theses.fr/2015SACLS067>

## II. Comportement des détergents

Dans le schéma classique de l'étude d'une protéine membranaire, la purification est l'étape qui suit l'expression. A partir de ce moment, et jusqu'à la fin, il est impératif d'utiliser des composés maintenant la protéine soluble en milieu aqueux. Les détergents sont une catégorie de molécules amphiphiles dotées de cette capacité qui sont très utilisés et pour lesquels j'ai étudié plusieurs aspects spécifiques de leur utilisation. Après la surexpression des protéines membranaires au sein d'un organisme hôte il est souvent nécessaire d'extraire ces protéines de la membrane et de les purifier. Cette dernière étape nécessite ses propres spécificités d'utilisation. En effet, le caractère amphiphile des protéines membranaires nécessite l'utilisation de composés permettant de les rendre solubles en milieu aqueux. Une des molécules ayant ce pouvoir sont les détergents. Le choix de ce dernier s'avère crucial lors de l'étude d'une protéine membranaire puisqu'il doit maintenir l'activité et la stabilité de la protéine. Il est à noter, par ailleurs, que d'autres agents permettant de maintenir en solution les protéines membranaires ont aussi été développés. Les nanodisques permettent de créer un environnement plus natif pour la protéine. Ils sont de nature protéique et composés d'un mélange de lipides et de « membrane scaffold protein », une protéine dérivée de l'apolipoprotéine (Civjan et al. 2003). Toujours de nature protéique, les peptidiscs sont un ensemble de peptide qui forme une couronne amphipathique autour de la protéine d'intérêt (Carlson et al. 2018). Les amphipols sont, quant à eux, des polymères amphiphiles qui se lient et entourent la protéine au niveau de sa région hydrophobe (Tribet, Audebert, et Popot 1996). Une autre catégorie de polymère jouant le rôle d'environnement amphipathique est les Styrene Maleic Acid co-polymer Lipid Particles (SMALPs). Ils ressemblent structurellement aux nanodisques mais la bicouche lipidique est entourée non pas d'une protéine mais du copolymère styrène-acide maléique (Morrison et al. 2016). Ces deux dernières alternatives possèdent l'avantage ne pas nécessiter l'utilisation de détergent avant de reconstituer la protéine puisqu'ils sont capables de l'extraire directement de la membrane. Une illustration de chacun de ces environnements se trouve en Figure 13.

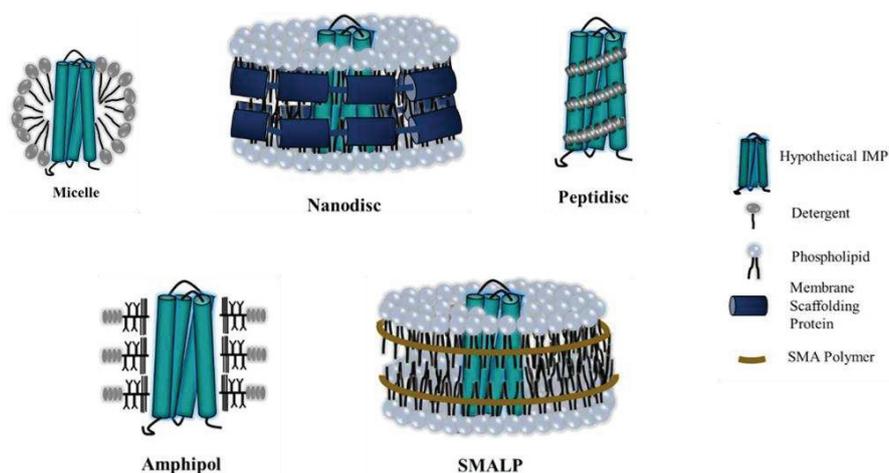


Figure 13 : Représentation schématique de quelques systèmes amphiphiles (D'après Danmaliki et Hwang 2020)

Mes propos seront axés sur les détergents puisque ce sont eux que j'ai utilisé pour résoudre les différentes structures et dont j'ai étudié les propriétés.

a. Les détergents : présentation générale

Les détergents sont un outil très couramment utilisé pour l'étude des protéines membranaires. Ce sont des molécules qui s'insèrent dans la membrane lipidique afin de la déstabiliser. Ils vont se positionner autour des parties hydrophobes de la protéine permettant ainsi de l'extraire de son environnement natif. Cette capacité est due à leur composition puisqu'ils possèdent une partie hydrophile et une chaîne carbonée hydrophobe (Figure 14). De ce fait, ils diminuent la tension de surface entre les deux milieux.

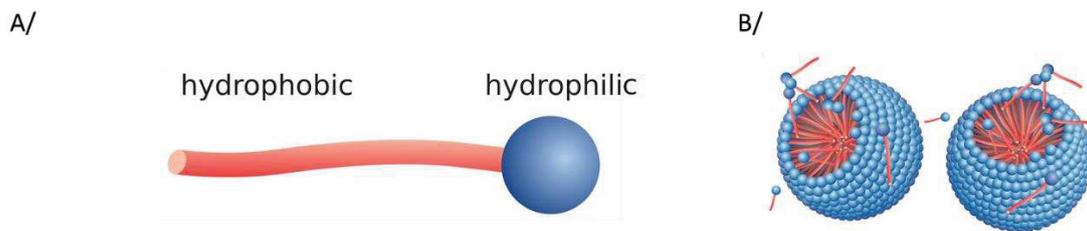


Figure 14 : Représentations schématiques des détergents sous forme de A/ monomère et de B/micelles.

(D'après « Surfactants & critical micelle concentration (CMC) - DataPhysics Instruments » s. d.)

Chaque détergent possède ses propres caractéristiques et n'est donc pas utilisable pour toutes les protéines. Par exemple, le type de charge qu'ils portent peut influencer sa capacité de solubilisation. Il existe des détergents ioniques, non-ioniques ou bien zwitterioniques (Figure 15).

- Le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un exemple de détergent anionique fort. Il possède une forte capacité de solubilisation.
- Les sels biliaires, tel que le cholate, sont des détergents chargés mais forment une classe de détergent légèrement différente. En effet, contrairement aux autres détergents qui possèdent des parties hydrophobe-hydrophile bien définies, ces acides sont composés d'un groupement stéroïde et ont une face polaire et une apolaire. Le cholate est un détergent plutôt doux.
- Les détergents non-ioniques comme les maltosides sont doux et non dénaturants. Ils rompent uniquement les liaisons lipides-protéines et lipides-lipides. Leur utilisation pour l'étude de protéine membranaire est alors courante.
- Les détergents zwitterioniques, Fos-choline ou CHAPS par exemple, sont électriquement neutres et capable de rompre les interactions protéine-protéine.

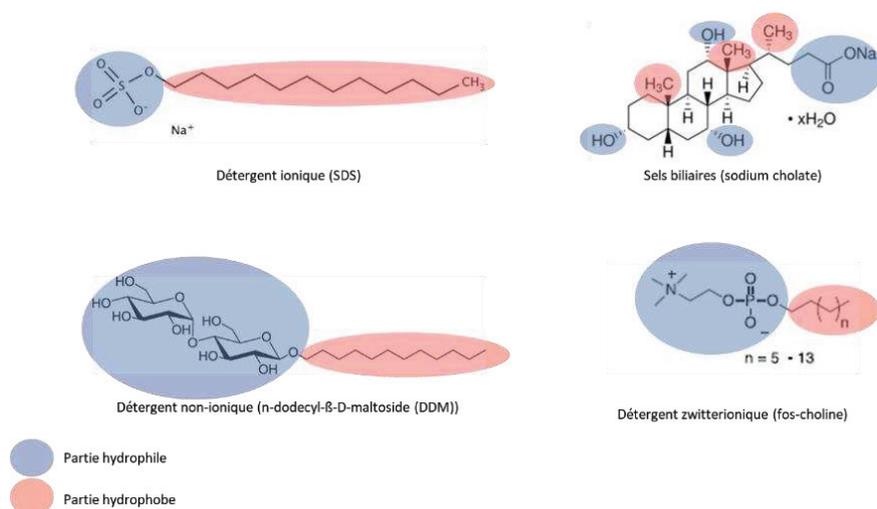


Figure 15 : Exemples de formule chimique de détergents

La concentration micellaire critique (CMC) est une caractéristique essentielle des détergents. Elle correspond à la concentration seuil à partir de laquelle les monomères s'assemblent sous forme de micelles (Figure 16).

Plusieurs paramètres ont un effet sur la CMC :

- Les sels ont la capacité de la diminuer en réduisant la répulsion entre les groupements chargés des détergents ioniques.
- La présence d'atomes chargés joue également un rôle. Des détergents zwitterioniques ont une CMC meilleure que des détergents ioniques. En effet, la présence de charges induit une répulsion entre les molécules de détergent qui tend à augmenter la CMC.
- La longueur de la chaîne aliphatique est également un paramètre à prendre en compte. Plus le nombre d'atomes de carbone est élevé, et donc la partie hydrophobe importante, plus la CMC est faible.
- La présence d'insaturation augmente la CMC.
- La nature des groupements chimiques qui composent le détergent joue également un rôle. Par exemple, un groupement fluoré aura tendance à diminuer la CMC par rapport à un hydrogène.

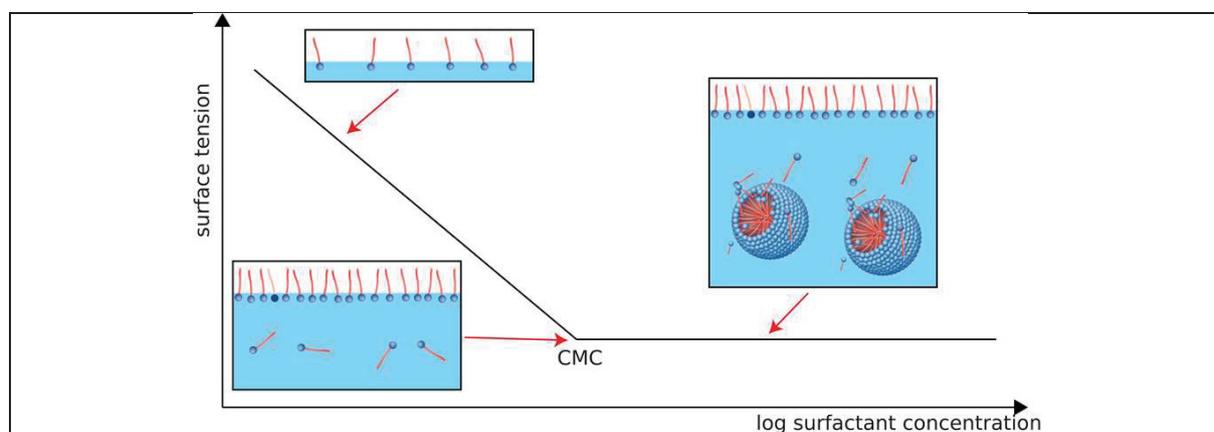


Figure 16 : Représentation graphique de la tension de surface en fonction de la concentration en détergent

Les différents états des détergents sont représentés dans les encadrés.

(D'après « Surfactants & critical micelle concentration (CMC) - DataPhysics Instruments » s. d.)

## b. Les détergents : fonctionnement

L'aptitude des détergents à extraire une protéine membranaire repose sur leur capacité d'échange, qui est souvent reliée à leur CMC. En effet, en solution et à une concentration inférieure à leur CMC, ils se dispersent sous forme de monomères. Puis, pour extraire une protéine de la membrane, les détergents, en concentration supérieure à leur CMC, perturbent la membrane plasmique en s'insérant entre les lipides. Un échange de détergent sous forme monomérique s'opère entre la bicouche lipidique et le milieu extracellulaire. Lorsque la membrane est saturée en détergent, seuil nommé  $R_{sat}$ , il y a coexistence de la bicouche lipidique et des micelles mixtes lipides/détergents et protéines/détergent. Le processus prend fin dès lors que l'ensemble des lipides se retrouve piégé au sein de micelles de détergents, seuil nommé  $R_{sol}$  (Figure 17).

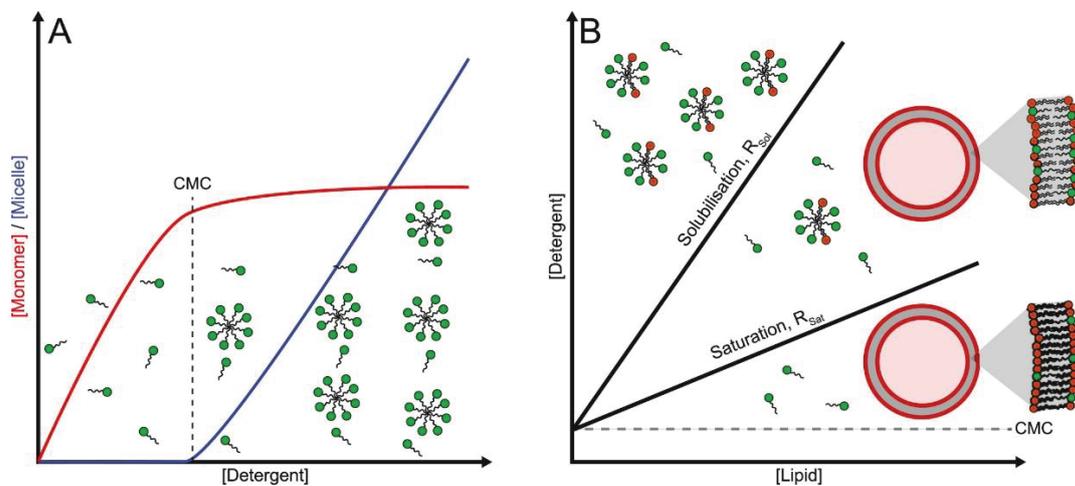


Figure 17 : Etapes de la solubilisation d'une protéine membranaire par les détergents

A : Représentation des détergents sous forme de monomères ou micelles en fonction de la concentration

B : Diagramme expliquant la solubilisation

(D'après Johansen et al. 2023)

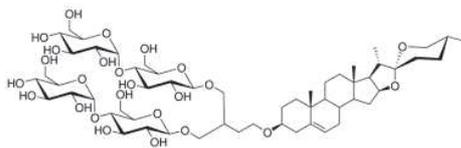
Il n'existe pas de méthode permettant de trouver le détergent adéquat pour chaque protéine. Il convient alors d'en tester plusieurs afin de mettre la main sur celui qui garde la protéine correctement repliée et active. Un détergent efficace lors de l'étape de solubilisation peut ne pas l'être lors de la purification ainsi que pour les études biochimiques et structurales.

Récemment, de nombreux détergents ont été développés. Par exemple, le glycodiosgenin (GDN), dont la formule est représentée en Figure 18, contient une partie hydrophobe rigide de nature stéroïde greffée à un dimaltoside qui est peu favorable aux interactions détergent-protéine mais la partie hydrophobe favorise l'interaction détergent-détergent. De par sa capacité de stabilisation des protéines, il est principalement utilisé pour la purification et la résolution de structures. Le LMNG (lauryl maltose neopentyle glycol), un dimère de DDM (N-dodecyl- $\beta$ -D-Maltoside) de la famille des néopentyle glycol présente l'avantage d'avoir une CMC 17 fois inférieure au DDM et une capacité d'interaction avec la membrane plus élevée grâce à la présence des deux chaînes acyles. Cette forte capacité d'interaction avec la

membrane et entre molécules de détergent contribue à son efficacité pour stabiliser les protéines membranaires et éviter la formation d'agrégats. Il est utilisé pour la solubilisation et la purification ainsi que pour des études structurales. Bien que le LMNG forme des micelles de taille assez grande, son interaction avec les protéines membranaires forment des complexes plus petits que ceux formés par le DDM. (Lee et al. 2022). Pour le transporteur BmrA, il a été montré que le nombre de molécules de LMNG lié à la protéine est environ 2 fois inférieur à celles de DDM (Chaptal et al. 2017).

Ces deux détergents, GDN et LMNG, sont principalement utilisés pour la résolution de structures par cryo-EM, notamment celles des protéines de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et des canaux. Depuis une dizaine d'années, ils ont permis à eux-seules la résolution d'environ 20% des structures uniques de protéines membranaires et sont particulièrement utilisés depuis 2 ans.

A/



B/

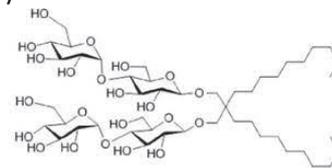


Figure 18 : Formules chimiques de deux détergents récemment développés

A/ GDN B/ LMNG

(D'après GmbH s. d.)

### c. Caractérisation de la couronne de détergent

La quantité de détergent présente dans l'échantillon joue un rôle important lors des études biochimiques et structurales puisqu'elle impacte la stabilité de la protéine. Il peut alors s'avérer utile de les doser et connaître la taille de la micelle.

Afin de réaliser une quantification précise des détergents présents dans l'échantillon, différentes méthodes ont été mises au point. Un dosage colorimétrique permet par exemple d'estimer les détergents comportant une partie saccharidique (DuBois et al. 1956). Plus récemment, une technique utilisant la chromatographie sur couche mince a été mise au point pour doser le N-dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM) et ses dérivés (Barret et al. 2013). Cependant, ces méthodes sont compliquées à mettre en œuvre et applicable uniquement à certains types de détergent. Récemment, l'équipe a développé une technique de dosage de détergent par MALDI-ToF MS. Elle est applicable à plusieurs classes de détergents et ce, même s'ils sont utilisés en mélange (Chaptal et al. 2017).

Afin de visualiser la couronne de détergent autour de la protéine le serveur Det.Belt a été développé. Cet outil permet d'estimer, *in silico*, la quantité de détergent présent dans la couronne et de visualiser son effet sur la protéine membranaire d'intérêt (Zampieri et al. 2021).

Je vais illustrer l'importance de cette caractérisation pour l'obtention de la structure de BmrA qui a permis la publication d'un article pour lequel je suis co-auteurice (Chaptal et al. 2022). Je vais concentrer mes propos sur la couronne de détergent mais l'ensemble de l'article sera détaillé dans la 2<sup>ème</sup> partie du manuscrit. L'obtention d'un cristal de BmrA a demandé de longues années d'optimisation et de recherche. Initialement, l'étude a débuté en utilisant un mélange de détergent DDM-cholate comme précédemment utilisé par l'équipe de Geoffroy Chang pour résoudre la structure de la glycoprotéine-P de souris, homologue de BmrA (Aller et al. 2009). Des mises au point au niveau du ratio DDM-cholate ont été nécessaires afin de trouver celui ayant permis d'obtenir le cristal. Comme illustré sur la Figure 19, l'augmentation de la quantité de cholate dans le mélange réduit de façon remarquable la taille de la couronne de détergent d'un facteur 2.

Added [Detergent], % (theor. ratio)	BmrA-bound detergent (exp. ratio)	Estimated Det. Belt radius, Å	Diffract.
0.035 DDM (-)	399 ± 30 (-)	27.2 ± 2.1	no
0.035 DDM 0.01 cholate-Na (3:1)	167 ± 49 32 ± 6 (5:1)	15.8 ± 4.9	8 Å
0.035 DDM 0.03 cholate-Na (1:1)	150 ± 23 21 ± 5 (7:1)	14.1 ± 2.5	4-6 Å
0.035 DDM 0.1 cholate-Na (1:3)	Non detec. 537 ± 81 (-)	29.0 ± 4.5	Agreg.

Figure 19 : Caractérisation de la couronne de détergents autour de BmrA

Le dosage de DDM a été réalisé grâce à la technique de MALDI-ToF précédemment cité. Le rayon de la couronne est déterminé en utilisant le serveur DetBelt.

D'après (Chaptal, Zampieri, Wiseman, Orelle, Martin, Nguyen, Gobet et al. 2022)

L'ensemble de ces outils permet de mieux caractériser les détergents et ainsi pouvoir manipuler la protéine d'intérêt de façon plus contrôlée.

Ainsi, on remarque que le choix du détergent est primordial pour l'étude des protéines membranaires. La couronne de détergent a des effets considérables sur la protéine, notamment lors d'études structurales où la taille de la micelle peut avoir un impact. C'est pourquoi la compréhension de leurs propriétés physiques et chimiques est d'un intérêt capital. Il est essentiel de pouvoir maîtriser le comportement du détergent et c'est dans cela que réside le but du paragraphe et de l'article qui suivent.

#### d. Les détergents : comportement pendant la concentration

L'investigation du comportement du détergent pendant la concentration a débuté lors de la mise au point de la méthode de dosage des détergents dans les différentes fractions de la purification de BmrA. Brièvement, BmrA est soumis à une chromatographie d'affinité dont le

pic d'éluion est concentré d'un facteur 10 à 20 pour être injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Le chromatogramme obtenu pour cette dernière est représenté en Figure 20 pour les 3 détergents testés : FC12, DDM et LMNG. Comme on peut le voir sur la courbe bleue de chacun des chromatogrammes, le profil d'éluion du détergent montre deux pics : un 1<sup>er</sup> correspondant à l'éluion du détergent en complexe avec la protéine et un 2<sup>ème</sup> correspondant au détergent libre. Pour le DDM et la FC12, il est clair que la présence de la protéine entraîne une surconcentration du détergent (courbe bleue) car la même expérience de concentration sans protéine entraîne un pic très modeste (courbe rouge, pic à 15-16 mL). Pour le LMNG qui forme probablement des micelles de formes allongées de grande taille, les profils d'éluion sont en revanche similaire car l'objet est de toute manière retenu sur le filtre du concentrateur.

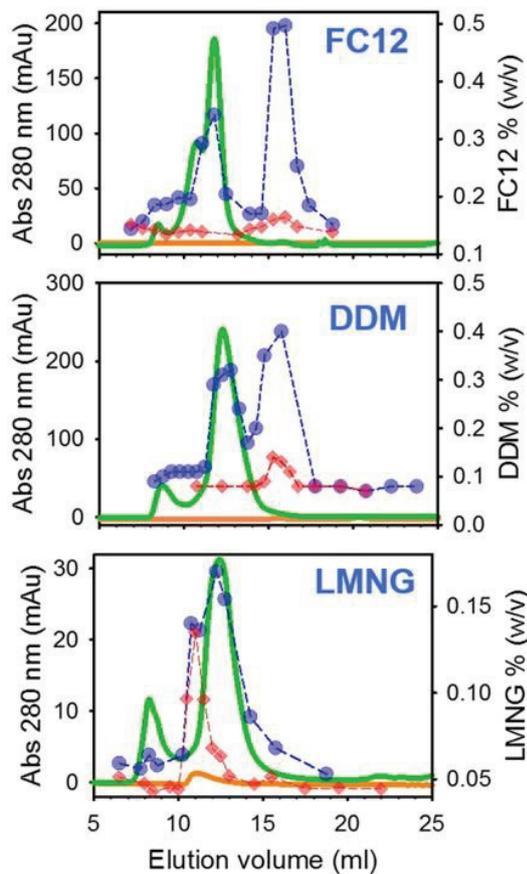


Figure 20 : Chromatogramme de SEC de BmrA purifiée en FC12, DDM et LMNG

Courbe verte : Chromatogramme de BmrA  
 Courbe bleue : courbe de quantification des détergents en présence de BmrA  
 Courbe rouge : courbe de quantification des détergents en absence de BmrA  
 Courbe orange : absorbance des détergents à 280 nm

(D'après Chaptal et al. 2017)

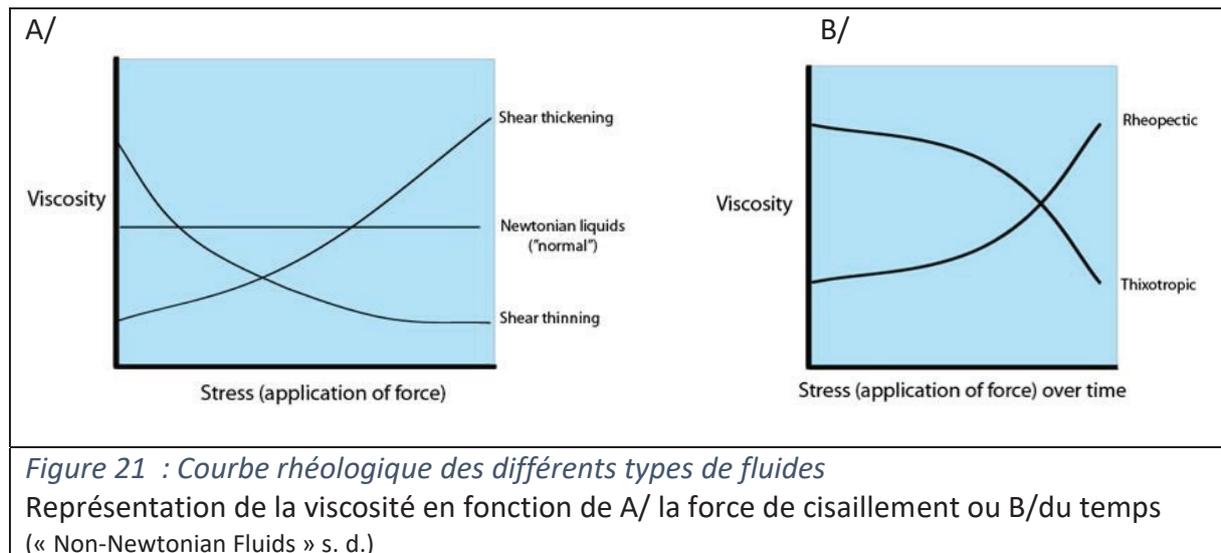
Ce paragraphe ainsi que la publication 2 apportent des éléments d'explication à ce phénomène.

En rhéologie, les fluides peuvent être classés en 2 catégories selon leur comportement. Si leur viscosité n'est pas modifiée sous l'application de force de cisaillement, ils sont qualifiés de newtoniens. A l'inverse, si la viscosité est impactée on parlera alors de fluides non-newtoniens. Ainsi, la relation entre viscosité et contrainte est linéaire pour un fluide newtonien et non-linéaire pour un fluide non-newtonien.

Utilisons l'exemple connu du mélange féculé de maïs/eau comme exemple : sans application d'une force de cisaillement, le mélange se comporte comme un liquide mais dès qu'il subit ce type de force, il se solidifie. On dit dans ce cas qu'il est rhéoépaississant. En effet, tous les

fluides non-newtoniens n'ont pas le même comportement. Certains se fluidifient sous la contrainte alors que d'autres se solidifient. Une notion de temps peut également jouer sur la viscosité et donc le comportement des fluides (Figure 21 :). Certains fluides peuvent combiner les 2 aspects, la force de la contrainte et l'effet du temps sur la viscosité.

Le comportement non-newtonien des détergents avait d'ailleurs déjà été décrit en réponse à des forces de déchirement, par des mesures de rhéologie (Shikata et al. 1988) (Wong et al. 2015) (Ionescu et al. 2020). Ces mesures ont été réalisées sur du détergent pur en solution, dans des conditions complètement différentes de celles expérimentales de biochimie structurales, et en absence de protéine.



Lors de l'étude des protéines membranaires la connaissance du comportement des détergents permet une meilleure maîtrise de leur utilisation. Lors de la purification, il n'est pas rare d'avoir besoin de concentrer l'échantillon. Il avait déjà été observé ce phénomène de sur-concentration du détergent en présence de protéine (Strop et Brunger 2005) (Feroz et al. 2016), qui peut représenter un obstacle majeur lors d'études structurales mais il n'avait jamais été expliqué. C'est pourquoi nous avons cherché à comprendre et caractériser ce phénomène afin de pouvoir le contrôler et le moduler.

#### e. Points majeurs de l'article

Afin de comprendre ce phénomène de sur-concentration, nous avons mené une série d'expériences. Nous avons tout d'abord montré que la sur-concentration était induite par des protéines solubles commerciales (tels que le lysozyme, l'albumine de sérum bovin (BSA) ou l'ovalbumine) mais aussi par des polymères non-protéiques (Dextran, un polymère de glucose) mais pas par la force ionique. Il s'agit donc d'une influence en *trans*, non par un contact direct entre la protéine membranaire et les micelles de détergent.

En rhéologie, la viscosité augmente avec les forces de déchirement dont fait partie la force centrifuge. Nous avons étudié l'effet de la variation de cette force sur le phénomène de sur-concentration. Il apparaît qu'en la diminuant, la quantité de détergent sur-concentré diminue également. Ceci permet de contrôler la quantité de détergent finale ; si la protéine a tendance

à agréger, augmenter la force centrifuge permet de garder du détergent et ainsi « protéger » la protéine. En revanche, si les détergents sont un frein à l'étude de la protéine (comme en cryo-EM par exemple), diminuer leur concentration peut être utile et donc limiter la force centrifuge lors de l'étape de concentration.

Nous avons visualisé ce phénomène à l'aide d'un colorant hydrophobe, la rhodamine phosphoéthanolamine (Rho-PE), qui révèle la formation d'un coussin au niveau du filtre du concentrateur. Ce coussin devient de plus en plus dense, témoignant une augmentation du nombre de micelles et donc de la viscosité. Plus l'échantillon est concentré, plus il retient du détergent, amplifiant donc le phénomène.

Enfin, nous avons montré que ce phénomène de sur-concentration se produit également avec des protéines membranaires. Comme il dépend de la quantité d'objet en solution, l'effet sur les protéines membranaires est plus subtil car nécessite une grande quantité de matériel, mais bien présent lorsque l'on concentre l'échantillon pour des expériences de cryo-EM ou cristallographie.

L'ensemble des caractéristiques sont le reflet d'un comportement non-newtonien des détergents lors de l'étape de concentration et nous avons mis au point des stratégies pour moduler cet effet.

Toutes ces observations ont contribué à l'optimisation de la cristallisation de BmrA dont les cristaux ont permis d'obtenir la première structure du transporteur en conformation OF en présence de substrat. A 500 g, BmrA avait tendance à précipiter avant d'atteindre 7 mg/mL et à 500 g, il y avait trop de sphérulites de détergent qui impactaient la formation des cristaux. Finalement, les concentrations optimales de BmrA étaient obtenues lors de centrifugation à des vitesses oscillant entre 500 et 1000 g.

- f. Publication 2 : The non-newtonian behavior of detergents during concentration is increased by macromolecules, in *trans*, and results in their over-concentration



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

# The non-Newtonian behavior of detergents during concentration is increased by macromolecules, in *trans*, and results in their over-concentration

Alexia Gobet <sup>a</sup>, Veronica Zampieri <sup>b</sup>, Sandrine Magnard <sup>a</sup>, Eva Pebay-Peyroula <sup>c</sup>,  
Pierre Falson <sup>a, \*\*</sup>, Vincent Chaptal <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR5086 CNRS University Lyon1, 7 passage du vercors, 69007, Lyon, France

<sup>b</sup> European Molecular Biology Laboratory, 71 Avenue des Martyrs, 38042, Grenoble, France

<sup>c</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, CNRS, IBS, F-38000, Grenoble, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 July 2022

Received in revised form

2 September 2022

Accepted 2 September 2022

Available online xxx

### Keywords:

Detergents concentration

Non-Newtonian effect

Membrane protein concentration

## ABSTRACT

Concentration of pure membrane proteins in detergent solution results in detergent concentration, albeit in unknown amounts. This phenomenon is observed in every lab working on membrane proteins, but has seldom been investigated. In this study, we explored the behavior of detergents mixed with membrane proteins during the step of sample concentration using centrifugal devices. We show that detergent over-concentrate with the presence of polymers, typically membrane or soluble proteins but also polysaccharides. The over-concentration of detergents depends on centrifugal force applied to the device. With the use of a specific dye, we observed the formation of a mesh on the concentrator device. Importantly, reducing the centrifugal speed allows to reduce the concentration of detergents when mixed to macromolecules, as tested with 3 different membrane proteins. All together, these results highlight the non-Newtonian behavior of detergents and provides a solid framework to investigators to improve drastically biochemical and structural studies of membrane proteins.

© 2022 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Detergents are essential tools to handle membrane proteins. Their use is widely spread from membrane proteins extraction, purification, biochemical investigations and structural determination [1–5]. Hundreds of detergents are commercially available and new ones are being designed with the goal to gain in membrane protein stability [6,7].

Despite this wide range of detergents available, they still remain sometimes difficult to use for many investigators, as detergents are hardly detectable. Thus, their impact on membrane proteins remained unforeseeable, despite a clear effect on protein function, or crystallization for example [8]. In order to track them, specific techniques have been developed like the use of radioactivity [9–12], thin layer chromatography [13], or more recently MALDI-

ToF [14]. With the later we were able to track and quantify detergents during purification of various membrane proteins, thereby bringing light on their behavior around their cognate protein. This allowed for a web server to be created to represent detergent belts around membrane proteins [15]. Overall, these tools allow rationalization of their use.

Here, we focus on understanding the behavior of detergents during the crucial step of sample concentration. Indeed, many techniques require a high protein concentration that are typically achieved using concentration devices in microfuges, which segregate smaller or greater particles than a given molecular weight cutoff. This is particularly the case for structural approaches such as X-ray crystallography and cryo-EM that require high protein concentration. However, this concentration step results in detergent concentration [14,16], in usually unknown proportions, and thus impacts experiments for downstream studies and leads to unreplicable results in crystallization or cryo-EM grid preparation. In addition, for harsh detergents, a high concentration might denature the protein. Using our method of detergent quantification with MALDI-ToF, we quantified detergent along the concentration

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [pierre.falson@ibcp.fr](mailto:pierre.falson@ibcp.fr) (P. Falson), [vincent.chaptal@ibcp.fr](mailto:vincent.chaptal@ibcp.fr) (V. Chaptal).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.09.004>

0300-9084/© 2022 Published by Elsevier B.V.

process, allowing to understand how it behaves and how to prevent its accumulation in the concentration compartment.

## 2. Material and methods

### 2.1. Detergent quantification by MALDI-ToF

All detergents were measured and quantified by MALDI-ToF mass spectrometry, except for Cholate, as described in Ref. [14]. Briefly, detergents are mixed with their deuterated cognate in known amount, and 1  $\mu$ L of the mixture is added to 9  $\mu$ L of matrix solution which is adapted to the type of detergent. 1  $\mu$ L of the final solution is laid on the MALDI target. Measures were carried out with a Mass Spectrometer equipped with a nitrogen UV laser ( $\lambda = 337$  nm, 3 ns pulse) and an accelerating voltage of 5 kV. Data were obtained by collecting 300 laser shots and spectra were recorded in a positive reflectron mode. UDM (undecyl-beta-D-maltopyranoside) was used to quantify DDM (dodecyl-beta-D-maltopyranoside).

### 2.2. Cholate quantification

A solution of 2 mg/mL of sodium cholate (Sigma, C6445) is prepared to realize a standard curve. In black 96 well microplates, a standard curve of 0,1,3,5 and 7  $\mu$ g of sodium cholate are deposited in a well, completed with buffer containing 20 mM Hepes-Na pH 7.5, 100 mM NaCl until 10  $\mu$ L. For the sample, 2 or 4  $\mu$ L of protein were mixed with the same buffer until 10  $\mu$ L. In each well, 190  $\mu$ L of concentrated sulfuric acid were added and samples were incubated for 10 min under agitation at room temperature. The absorbance is read at 389 nm on the spectrophotometer SAFAS FLX-Xenius. Special precautions must be taken to handle concentrated sulfuric acid, and waste must be carefully collected. The use of a clear lid above the 96 well plate is recommended, even during reading. Used concentrated, sulfuric acid is not as reactive as the diluted one, and its use is nevertheless very easy to a cautious experimentalist.

### 2.3. Use of Rhodamine-PE to visualize detergent concentration

RhodaminePE (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl), Avanti Polar Lipids, 810157) in 100% chloroform is evaporated with a SpeedVac (SPD SpeedVac, rotor RH64-11, ThermoScientific) for 15 min at room temperature. The pellet of RhodaminePE is suspended in 20 mM HEPES-Na pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.035% DDM, to a final concentration of 500  $\mu$ M. This solution is then diluted to 5  $\mu$ M of RhodaminePE to a buffer containing Ovalbumin (Ovalbumin 1 mM is solubilized in 20 mM HEPES-Na pH7.5, 100 mM NaCl, 0.035% DDM) and concentrated at 20  $^{\circ}$ C as described below. 15 ml of solution were concentrated.

### 2.4. BmrA purification

BmrA was expressed and purified as described in Ref. [17]. Briefly, BmrA is overexpressed in C43(DE3) $\Delta$ AcrB for 5 h at 22  $^{\circ}$ C. Then, cultures are centrifuged and bacterial pellet resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Bacteria are lysed by 3 passages at 18,000 psi with a microfluidizer (Microfluidics IDEX Corp). Lyzed bacterial suspension is first centrifuged 15 min at 15,000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C to discard unbroken cells, then membranes are collected by centrifugation for 1 h, 4  $^{\circ}$ C at 180,000 $\times$ g. Membranes are resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (50 mL buffer corresponding to 4 L of culture), and centrifuged again with identical parameters. Membranes are suspended in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M sucrose, 1 mM EDTA (in 5 mL total) and stored in liquid nitrogen.

Membranes are solubilized at 5 mg/mL in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol, 4.5% (v/v) Triton X-100 and 1X CLAPA antiprotease, under gentle agitation at 4  $^{\circ}$ C. Solubilized membranes are centrifuged at 100,000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C for 40 min. The supernatant is loaded onto a pre-equilibrated Ni<sup>2+</sup>-NTA column, unbound material is washed with 20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1.3 mM DDM, 1 mM sodium cholate. BmrA is eluted from the column using the same buffer with 200 mM imidazole. The fractions of BmrA are pooled, diluted 10 times in 20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl, 1.3 mM DDM (0.035% weight/volume), 1 mM sodium (0.03% weight/volume) cholate and loaded again onto the same resin, preequilibrated without imidazole, for a second affinity chromatography. The pool of BmrA is concentrated on a 50-kDa cutoff Amicon (Millipore) device at 1000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C, and injected onto a Superdex 200 (GE healthcare) using a mobile phase 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.7 mM DDM and 0.7 mM sodium cholate.

### 2.5. AcrB purification

Five milliliters of AcrB membranes prepared as described in Ref. [18] were solubilized in 40 mL buffer (10% glycerol, 50 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 2% DDM) for 1 h under agitation at 4  $^{\circ}$ C, followed by centrifugation at 150,000 $\times$ g for 1 h at 4  $^{\circ}$ C. Supernatant was collected and incubated 20 min with loose Ni-NTA resin (pre-washed with 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.2% DDM, 10% glycerol, 10 mM imidazole) and applied on a gravity column. The resin was washed with the same buffer followed by a more stringent wash with 50 mM imidazole. AcrB was eluted with 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.02% DDM, 10% glycerol, 200 mM imidazole, concentrated at 2000 $\times$ g on a 50-kDa cutoff Amicon (Millipore) device. Concentrated protein was diluted 40 times to 20 mL final volume in 10 mM Hepes-NaOH pH 7.0, 0.02% DDM (0.4  $\mu$ M final AcrB concentration), divided in 2 for concentration experiment at 5000 $\times$ g or 500 $\times$ g.

### 2.6. LacY expression and purification

*E. coli* lactose permease (LacY) mutant C154G was expressed and purified as described in Refs. [14,19]. Briefly, transformed XL1-Blue bacteria were cultured in 4 1-L culture batches in 5 L flasks of LB media supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL final), at 37  $^{\circ}$ C until OD<sub>600nm</sub> reached 0.6, and induced with IPTG for 4 h. Cells were harvested, suspended in 80 mL of 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM PMSF and left overnight at 4  $^{\circ}$ C under gentle agitation. Cells were lysed by 3 passages at 18,000 psi with a microfluidizer (Microfluidics IDEX Corp), unbroken cells were discarded by centrifugation 15 min at 15,000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C and membranes harvested by centrifugation of the supernatant for 1 h, 4  $^{\circ}$ C at 180,000 $\times$ g. Dry membranes were stored at -20  $^{\circ}$ C.

Dry membranes were suspended in 20 mL buffer A (50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole, 0.035% DDM) using a glass homogenizer, incubated for 1 h at 4  $^{\circ}$ C under agitation with 2% DDM final. Solubilized membranes were spun 20 min at 4  $^{\circ}$ C at 40,000 $\times$ g, and supernatant loaded onto a pre-equilibrated Nickel column. Weakly bound contaminants were discarded using 20% buffer B (50 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 250 mM imidazole, 0.035% DDM) and LacY eluted with 100% step of buffer B. The elution peak was collected, concentrated on a 50-kDa cutoff Amicon (Millipore) device at 5000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C, and loaded on a Superdex 200 (GE Healthcare) with a mobile phase of 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.02% DDM.

Concentration experiment was conducted at 0.1 mg/ml final (2.3  $\mu$ M) in 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.02% DDM. Twenty five milliliters of purified LacY were divided in 2

concentrators and concentrated at 5000×g or 500×g, and DDM measured as described above and below.

## 2.7. Concentration experiments

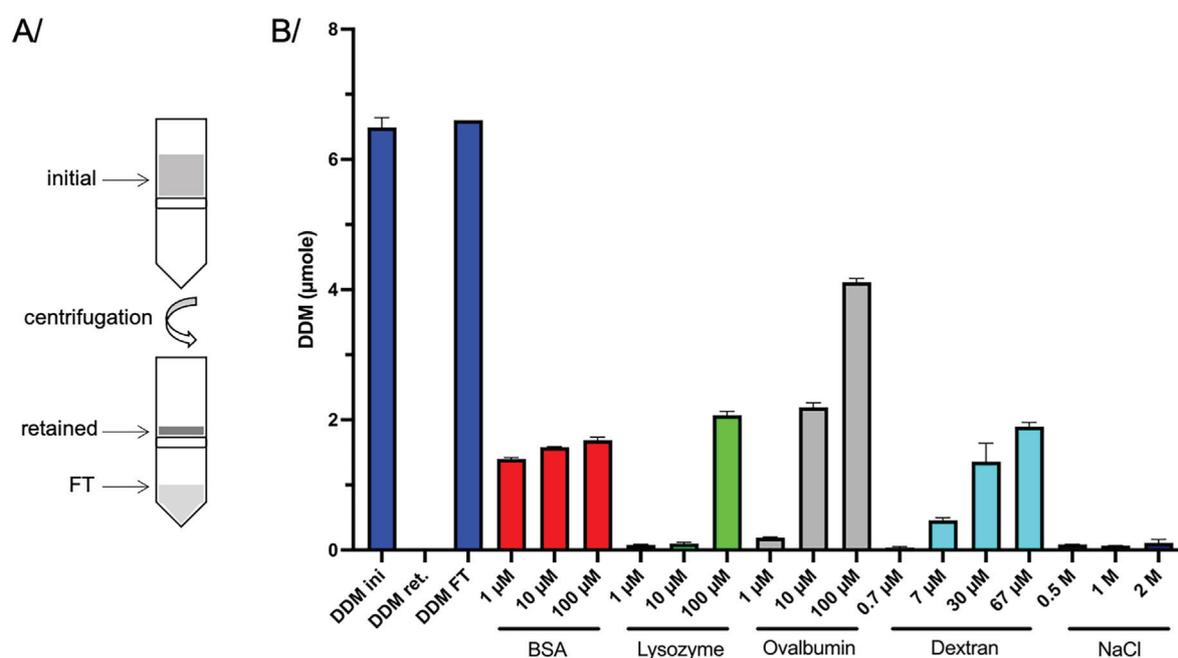
All concentrations were carried out on a Multifuge X1R (Heraeus) equipped with a HighConic II rotor (ThermoScientific). Concentrator devices were all made of regenerated cellulose, containing 15 mL volume above the concentrating membrane, with a 50-kDa cutoff (Amicon Ultra-15 device). All devices were placed such that the membranes were parallel to the rotation axis with the membranes placed vertically, contrary to what is recommended by the manufacturer, to reduce protein aggregation on the membrane. All concentration experiments were carried out at fixed temperature (20 °C or 4 °C), at fixed centrifugal forces (500 or 5000×g), for specified time interval. Samples were homogenized by gently inverting the tube 3 times in-between each centrifugal run if more than one run was needed to fully concentrate the sample. Some experiments were carried out without mixing, as stated in the text. All experiments were carried out to reach the dead volume of the concentrator or close to it. Experiments were stopped when the retained volume felt appropriate, and this volume measured (Table 1). Note that every experiment differs in retained volume, and is the reason why the detergent amounts are reported in quantities and not in concentrations. The buffer use in every experiment is 50 mM Hepes-Na pH 7.5, 100 mM NaCl. It is important to not use Hepes-free acid, as it prevents crystallization of the MALDI matrix and thus proper measurement.

Dextran (80 kDa, Sigma-Aldrich ref: 00892), Ovalbumine (Thermofischer ref: 23209), BSA (fraction V, Euromedex ref: 04-100-812-C) and lysozyme (Sigma-aldrich ref: L6876).

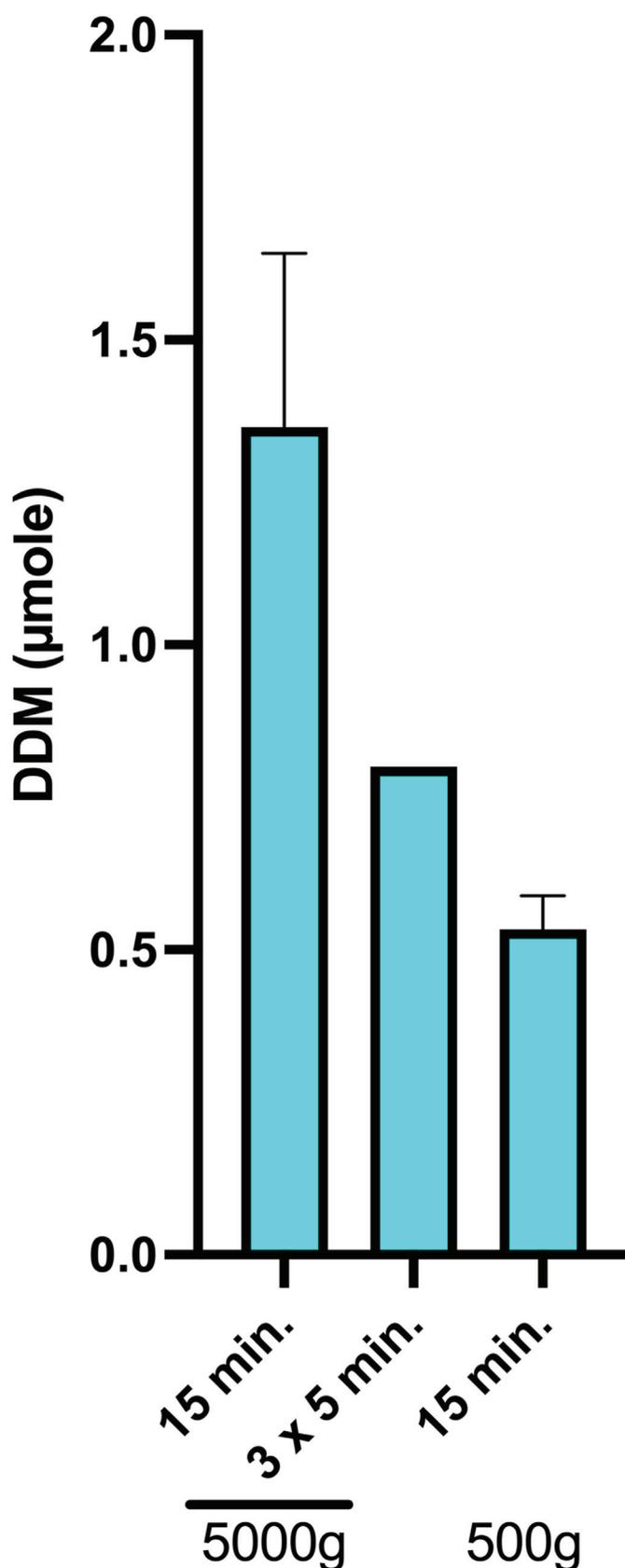
## 3. Results

### 3.1. DDM over-concentrate with macromolecules in a concentration-dependent manner

It has been shown in several articles that detergents over-concentrate during the concentration step [8,9,12,14,16]. The reason for this phenomenon however remained unclear, ranging from direct interactions between micelles and detergent belts, non-specific interactions with the protein, or other effects. To investigate this phenomenon, detergent behavior was evaluated during the concentration step in varying conditions for the most used detergent, the dodecyl-maltopyranoside (DDM) (Fig. 1A) [1,2]. The negative control of solely DDM without macromolecule results in an absence of DDM over-concentration, all the DDM molecules go through the filter and end up in the flow-through fraction, as expected (Fig. 1B). Indeed, even though the concentrator used display a 50-kDa cutoff, and the DDM micelle being formed from 80 to 110 monomers has an expected mass around 50-kDa, it is stated by the manufacturer that the pores made by regenerated cellulose open during centrifugation and let objects twice the mass of the molecular cutoff pass through. On the contrary, the addition of proteins to the same DDM solution results in over-concentration of DDM in the retained fraction. This behavior is observed in a concentration-dependent manner, as DDM over-concentrates with increasing protein concentration. Of note, for BSA or Ovalbumin, the effect is observed even at modest protein concentration, while for Lysozyme a higher protein concentration is needed to observe an impact on detergent concentration. Lysozyme being a smaller protein of 14 kDa, it goes through the concentrator pores (50-kDa) and doesn't concentrate at low concentrations. After a certain lysozyme concentration (100 μM), the protein is concentrated



**Fig. 1.** Detergent over-concentration with macromolecules. A/Overall scheme of the experiment, where a detergent-containing solution is placed on a concentrator, centrifuged, resulting in retained and flow-through (FT) fractions. B/DDM quantification during concentration experiments, at 5000×g. Dark blue: quantification when no macromolecule is added to a DDM solution at 2x Critical Micelle Concentration (CMC) (0.03% (w/v), 0.6 mM), for initial, retained and FT fractions. Red: concentration of DDM in the presence of increasing quantity of BSA. Green: concentration of DDM in the presence of increasing quantity of Lysozyme. Grey: concentration of DDM in the presence of increasing quantity of Ovalbumin. Cyan: concentration of DDM in the presence of increasing quantity of Dextran (80 kDa). Black: concentration of DDM in the presence of increasing quantity of sodium chloride. Error bars show the standard deviation, the experiment being done in triplicate. All experiments were carried out in the same buffer base (50 mM Hepes-Na pH 7.5, 100 mM NaCl), and concentration was stopped when it reached the dead volume of the concentrator. Note that this volume varies with each experiments, retained volumes are reported in Table 1.



**Fig. 2.** Influence of centrifugal force on detergent over-concentration. A DDM solution (0.03% (w/v), 0.6 mM) with dextran was concentrated for 15 min at 5000×g, or 3 times 5 min at 5000×g with mixing in-between, or one time at 500×g. Error bars show the standard deviation, experiments reproduced 3 times. The volume reduction factor is almost the same in all 3 experiments (STable 1).

enough to create an effect on the detergent and results on its over-concentration. To evaluate the impact of non-protein type polymers, Dextran was also tested and shows the same pattern of DDM over-concentration with increasing Dextran concentration. Sodium chloride however, has no influence, even at high concentration, refuting an effect of charges on the phenomenon.

These results exemplify the impact of macromolecules, but not necessarily proteins, on DDM over-concentration, in a concentration-dependent manner. It has been demonstrated that BSA can bind a few lipid monomers [12] (up to 20 monomers), so some detergent binding is expected, albeit with limited influence. Detergent binding has however not been detected on Lysozyme or Ovalbumin, neither on Dextran, ruling out the direct interaction of DDM with macromolecules in the context of over-concentration. The over-concentration of DDM is thus happening in *trans*.

### 3.2. DDM over-concentration depends on centrifugal force

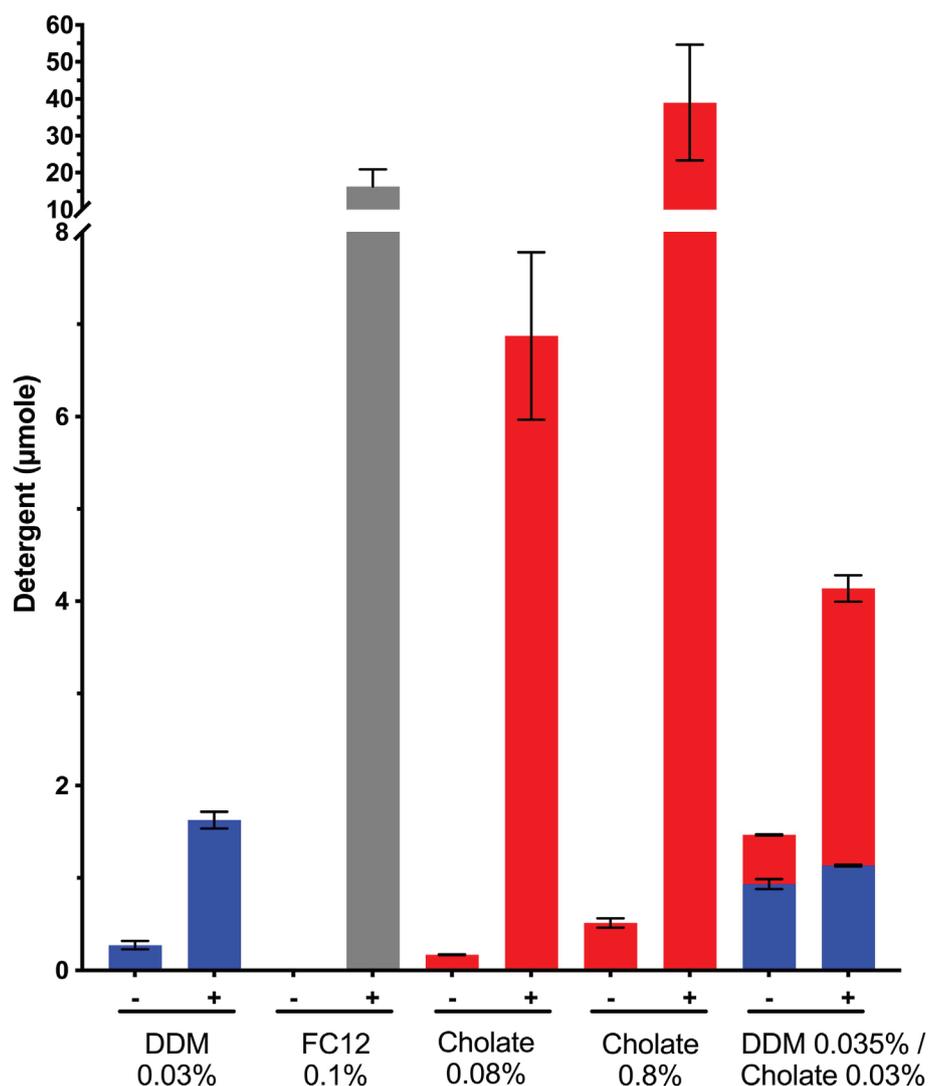
To further evaluate the influence of macromolecules on DDM over-concentration, the same condition as in Fig. 1B (30 μM Dextran) was concentrated at different centrifugal speed (Fig. 2). Maximum DDM amount was found in the concentrated fraction when the device was spun 15 min at maximum speed of 5000×g. Interestingly, 3 runs of 5 min done at the same speed, but with mixing in-between, reduces the amount of DDM in the concentrated fraction. A further decrease in centrifugal force to 500×g diminishes even more the DDM quantity. The volume reduction factor is the same in all three experiments, starting from the same initial volume (15 ml) and ending in almost the same dead volume (STable 1), stating that the effect on DDM concentration is not linked to experimental differences but is resulting from the different force applied. There is thus an effect on centrifugal forces on the accumulation of DDM in this context.

### 3.3. Over-concentration varies with the micelle size

We thus investigated the impact of the type of detergent on the over-concentration phenomena (Fig. 3). In addition to DDM, another detergent with 12 carbon tail was investigated, while carrying a zwitterionic head group, FosCholine 12 (FC12). FC12 has a smaller aggregation number than DDM, and results in a micelle of around 40 kDa. Cholate, another charged detergent, was also included in the study. Cholate has a very small aggregation number (less than 10 monomers) and carries a different structure compared to the classical one of DDM. For each detergent, an over-concentration is being observed in the presence of Ovalbumin. The amount of detergent kept in the retained fraction of the concentrator varies from one detergent to the other, and is in general greater for charged detergents. For Cholate, 2 concentrations were tested as the over-concentration was not anticipated to be so large for the lower concentration (0.08%). The larger concentration of 0.8% results in a much greater retention of Cholate in the presence of Ovalbumin. The mixture of DDM and Cholate was tested since it was successfully implemented for structure resolution of several proteins [17,20]. It was previously reported that the mixed DDM/Cholate micelle is smaller than the DDM micelle so it is surprising to observe more detergent retained than DDM or Cholate alone. It is probably due to the fact that the micelle is smaller [17], but it also results in more objects in solution, creating a crowding effect (cf. below). The addition of Ovalbumin results in the over-concentration of both detergents.

### 3.4. Visualization of a detergent gradient clogging the concentrating device

In order to visualize how detergents over-concentrate, a



**Fig. 3.** Impact of the micelle size on the concentration of detergents. A solution with detergent and with (+) or without (-) Ovalbumin (1 mM) was concentrated at 5000×g until the void volume or until the solution does not pass through the filter anymore. Dark blue represents DDM, grey is for FosCholine 12 and red for sodium cholate. DDM at 0.03%(w/v) (0.6 mM), FC12 at 0.1%(w/v) (2.8 mM), Cholate 0.08%(w/v) (1.9 mM), Cholate 0.8%(w/v) (19 mM), and DDM/Cholate mixture at 0.035%(w/v) (0.7 mM) DDM/0.03%(w/v) (0.7 mM) Cholate. Error bars show the standard deviation, measures were done in triplicate and conducted in the same buffer (50 mM Hepes-Na pH 7.5, 100 mM NaCl).

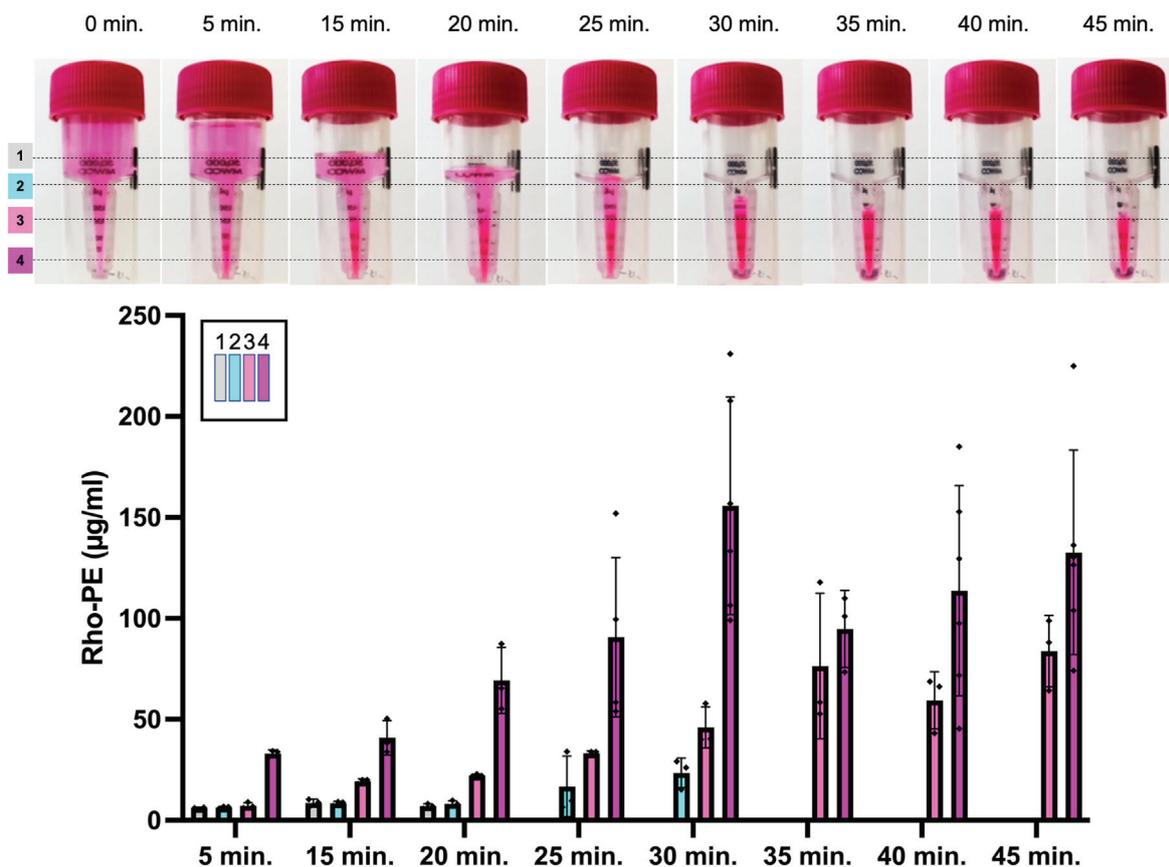
hydrophobic dye was added to the DDM solution. The dye, Rhodamine-PE (Rho-PE), is composed of a phosphatidyl ethanolamine moiety that insert into DDM micelles, and a rhodamine moiety that confers absorbance at 570 nm. Rho-PE was added in small quantity in order to perturb as little as possible the DDM micellar properties.

A batch solution of DDM solution with Ovalbumin was complemented with Rho-PE, divided in concentrators and concentrated by 5-min. increments without mixing with the goal to maximize the observation (Fig. 4). For each centrifugation time, a sample was collected at given depth and quantified using absorbance (Fig. 4). With time, a darker patch forms towards the bottom of the concentrator filter. Quantification shows that Rho-PE absorbance increases equally. A maximum absorbance is reached after 30 min, also coinciding with the fact that further concentration only decreases volume by minimal amounts. This experiment reveals the creation of a concentrated patch at the bottom of the concentrator after initial concentration, that grows upwards as time goes, thereby creating a mesh preventing further macromolecule to go through.

### 3.5. Impact on membrane protein concentration

With the knowledge of detergent behavior influenced by macromolecules, this behavior was evaluated in the presence of membrane proteins. Three membrane proteins were investigated, the multidrug transporter BmrA from *B. subtilis* [17,21], Lactose permease from *E. coli* (LacY) [19,22], and the Acridone resistance protein from *E. coli* (AcrB) [18]. These proteins were chosen as they have all been subjected to structural studies by X-ray crystallography or cryoEM, which require high protein concentrations and might thus experience increased detergent concentration. Additionally, it was previously observed for BmrA and LacY that, after concentration of a pool after a nickel column followed by separation on a size exclusion chromatography, the quantity of detergent over-concentrated was higher than if the same concentration was performed without protein [14]. It was already an indication of detergent over-concentration triggered by membrane proteins.

BmrA was purified with the detergent mixture DDM and Cholate that yields smaller micelles as well as smaller detergent belts around BmrA [17]. Concentration at 500×g results in less detergent



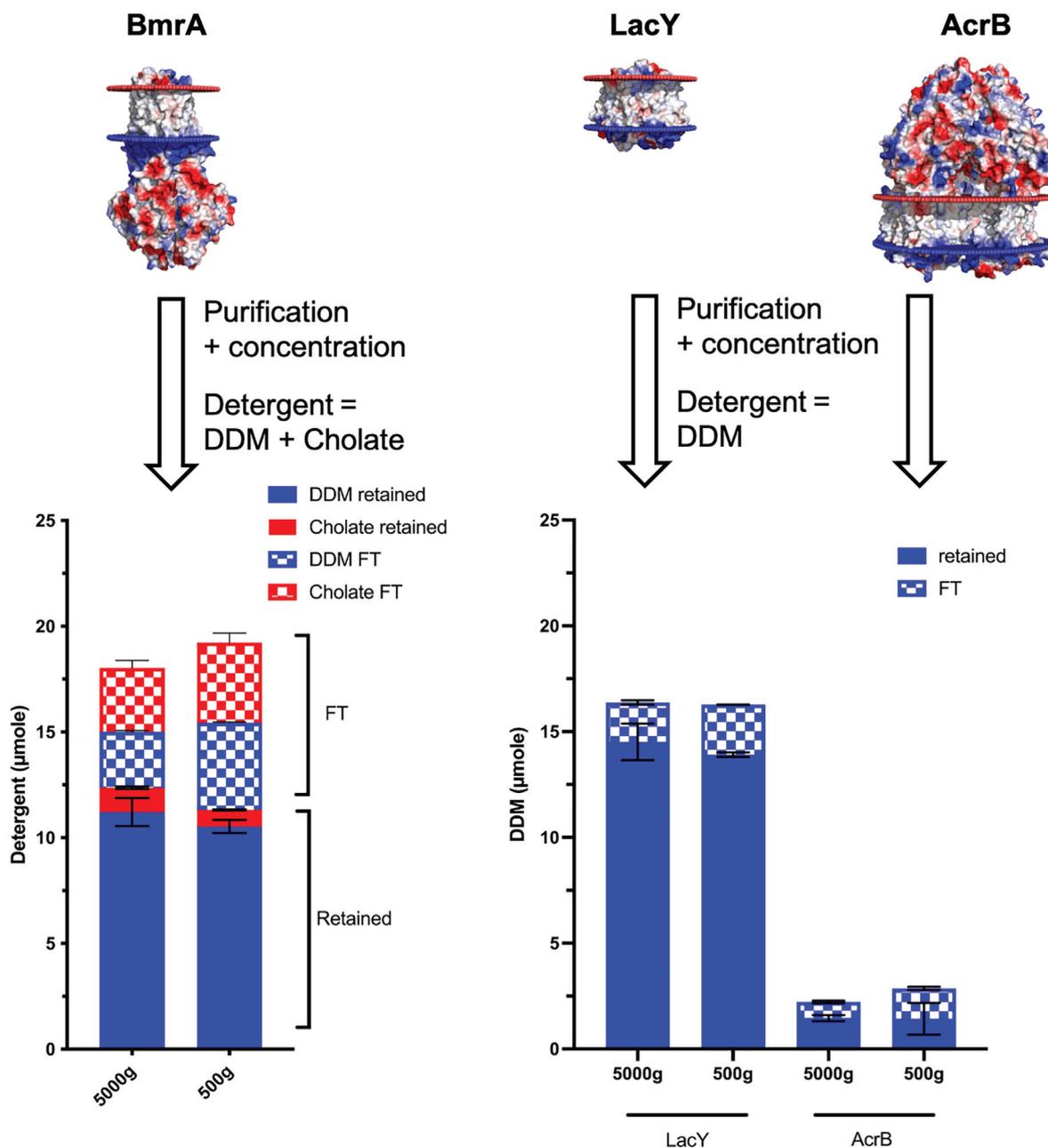
**Fig. 4.** Visualization of the detergent gradient on a concentrating device. A solution of DDM (0.035%(w/v) (0.7 mM) mixed with Rhodamine-PE (Rho-PE, dye) and Ovalbumin (1 mM) was concentrated by 5-min. increments at  $5000\times g$ , without mixing in-between each run. A photo was taken at each step, with a representative experiment shown on top. Rho-PE was quantified by spectrophotometry by pipetting a sample at different depth positions along the concentrator (levels 1, 2, 3 or 4). Rho-PE quantification is shown below for each time point and depth level colored according to the legend (square). Each data point is represented. The histogram corresponds to the mean with standard deviation. The experiments were conducted in triplicates or sextuplicates, photo experiments conducted in decaplicates showing always the same pattern.

retained, and more detergent passing through the filter compared to the higher speed concentration at  $5000\times g$  (Fig. 5). This pattern is observed for both DDM and Chololate independently. Together, these effects add up to more detergent being retained when the highest speed is used. Of note, the BmrA concentration used for this experiment is  $4\ \mu\text{M}$ , much less than protein concentration used in previous figures, which reflects the fact that detergent over-concentration is always present yet subtle enough to stay in disguise. LacY and AcrB were both purified in DDM only, and subjected to differential speed centrifugation before detergent quantification. For LacY, a lot more detergent passes through the concentrator at  $500\times g$  compared to  $5000\times g$ , reflecting the fact that less detergent is retained, as suggested by quantification in the concentrated fraction. Similar effects are observed for AcrB. For both LacY and AcrB, the concentrations used in the experiment ( $2.3\ \mu\text{M}$  and  $0.4\ \mu\text{M}$  respectively) highlights the fact that the detergent over-concentration phenomenon is a hidden phenomenon in membrane proteins biochemical analyses.

#### 4. Discussion

Detergent over-concentration is a real problem for membrane protein investigations, as it blurs signals and is concentrated in usually unknown amounts. In some cases, a high amount of detergent leads to protein denaturation. To shed light on this phenomenon, we have conducted the present study, resulting in the major finding that DDM gets over-concentrated by

macromolecules in solution, in a concentration-dependent manner. This behavior is also observed with non-protein polymers such as dextran, but not with salt, revealing that it happens *in trans*, i.e., with no direct interaction with the polymer. It could have been hypothesized some kind of interaction between detergent micelles and detergent belts surrounding membrane proteins, but the data presented on soluble proteins and Dextran refute this claim. We could also modulate this phenomenon by playing with the centrifugal forces, reducing the over-concentration by decreasing the centrifugal speed. Centrifugal forces are described as shear forces, which directly points to behavior of non-Newtonian fluids. Furthermore, it has previously been shown that detergents can behave as non-Newtonian fluids in specific conditions [23–25]. Here, we observe that macromolecules enhance the described non-Newtonian behavior of detergents as observed during centrifugation. It is this property that results in detergent over-concentration. In support of this, it has been shown in colloidal suspensions that shear thickening arises, at the molecular level, from particle clustering [26]. It is tempting to speculate that a similar phenomenon happens with detergent micelles and macromolecules in suspension in the concentrator. This increased viscosity is also observed on the concentrator when Rho-PE is added to bring color to detergent micelles. Indeed, the formation of a brighter spot at the bottom of the concentrator right at the beginning of the concentration experiment denotes the formation of a mesh, precluding passage of further detergent through the concentrator pores. It results in the mesh growing as



**Fig. 5.** Detergent over-concentration in presence of membrane proteins. Three membrane proteins were purified and subjected to centrifugation at different speed (500 or 5000×g) followed by detergent quantification. For each protein, the retained detergent is represented as solid color, and the flow-through fraction with white squares. DDM is colored in blue, and Cholate in red. BmrA was purified in the mixture of DDM and cholate, LacY and AcrB were purified in DDM.

more time is spent concentrating, thereby clogging the whole device. This direct visualization of a phenomenon is also reminiscent of the observation that more time spent concentrating a membrane protein does not correlate with more liquid passing through the concentrator. Now, our investigations shed light on a well-known fact in many labs across the world but never explained.

Interestingly, the non-Newtonian behavior of detergents can be modulated with centrifugal force and concentration. For example, mixing the solution in-between two centrifugation steps decreases the local macromolecule concentration and reduces the accumulation of detergent. Also, the total amount of detergent remaining after the process can be modulated depending on the application. If

fewer detergent concentration is needed, a decreased centrifugal force can be applied. On the contrary, if stability of the membrane protein is required, a higher detergent concentration is privileged to help stabilize the protein, reached by applying higher centrifugal forces, thereby providing a mean to biochemists to control and modulate their sample.

This strategy was adopted to solve the X-ray and cryo-EM structures of BmrA [6,17]. It has been previously shown that controlling the amount of detergent favors crystallization of the ADP/ATP exchanger [8]. We hypothesized the same for BmrA as crystals were initially not of good quality. We decreased the centrifugal force to 500×g to decrease detergent concentration and grow good crystals for structure solving. This sample was also of good quality

to be imaged by cryo-EM and yielded also a structure by this approach.

Altogether, the results presented here reveal the non-Newtonian behavior of detergent when in solution with macromolecules. With this knowledge in hands, investigators are also provided with means to control it and identify it to better handle their samples.

### Author contributions

VC and PF conceptualized the work. AG, VZ, SM, EPB and VC gathered and collected data. VC, PF, VZ and AG analyzed data. VC wrote the manuscript with contributions from all authors.

### Funding sources

AG, SM, PF and VC thank the ANR-19-CE11-0023-01 Biotiflux for support.

### Acknowledgements

This work was performed on the Protein Science Facility for detergent quantification, part of the SFR Bioscience (UAR2444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.09.004>.

### References

- [1] C. Le Bon, et al., Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy, *Q. Rev. Biophys.* (2021) 1–62.
- [2] B.C. Choy, et al., A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863 (3) (2021), 183533.
- [3] V. Zampieri, et al., CryoEM reconstructions of membrane proteins solved in several amphipathic solvents, nanodisc, amphipol and detergents, yield amphipathic belts of similar sizes corresponding to a common ordered solvent layer, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* (2021), 183693.
- [4] T. Gewering, et al., Know your detergents: a case study on detergent background in negative stain electron microscopy, *J. Struct. Biol.* 203 (3) (2018) 242–246.
- [5] A. Stetsenko, A. Guskov, An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization, *Crystals* 7 (7) (2017) 197.
- [6] K.A. Nguyen, et al., Glycosyl-substituted dicarboxylates as detergents for the extraction, over-stabilization, and crystallization of membrane proteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57 (11) (2018) 2948–2952.
- [7] P.S. Chae, et al., Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins, *Nat. Methods* 7 (12) (2010) 1003–1008.
- [8] C. Dahout-Gonzalez, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59 (Pt 12) (2003) 2353–2355.
- [9] M. le Maire, et al., Gel chromatography and analytical ultracentrifugation to determine the extent of detergent binding and aggregation, and Stokes radius of membrane proteins using sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase as an example, *Nat. Protoc.* 3 (11) (2008) 1782–1795.
- [10] S. Ravaut, et al., The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state, *Biochem. J.* 395 (2) (2006) 345–353.
- [11] U. Kragh-Hansen, et al., Detergents as probes of hydrophobic binding cavities in serum albumin and other water-soluble proteins, *Biophys. J.* 80 (6) (2001) 2898–2911.
- [12] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (1–2) (2000) 86–111.
- [13] L.A. Barret, et al., A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies, *J. Chromatogr. A* 1281 (2013) 135–141.
- [14] V. Chaptal, et al., Quantification of detergents complexed with membrane proteins, *Sci. Rep.* 7 (2017), 41751.
- [15] V. Zampieri, et al., The Det.Belt server: a tool to visualize and estimate amphipathic solvent belts around membrane proteins, *Membranes* 11 (7) (2021) 459.
- [16] H. Feroz, et al., Concentrating membrane proteins using ultrafiltration without concentrating detergents, *Biotechnol. Bioeng.* 113 (10) (2016) 2122–2130.
- [17] V. Chaptal, et al., Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter, *Sci. Adv.* 8 (4) (2022), eabg9215.
- [18] K.M. Pos, K. Diederichs, Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of AcrB, an inner-membrane multi-drug efflux protein, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58 (Pt 10 Pt 2) (2002) 1865–1867.
- [19] V. Chaptal, et al., Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (23) (2011) 9361–9366.
- [20] A.B. Ward, et al., Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (33) (2013) 13386–13391, <https://doi.org/10.1073/pnas.1309275110>.
- [21] E. Steinfelds, et al., Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* 43 (23) (2004) 7491–7502.
- [22] H.R. Kaback, A chemiosmotic mechanism of symport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (5) (2015) 1259–1264.
- [23] T. Shikata, et al., Nonlinear viscoelastic behavior of aqueous detergent solutions, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 28 (2) (1988) 171–182.
- [24] K. Wong, et al., Basic physicochemical and rheological properties of detergent sclerosants, *Phlebology* 30 (5) (2014) 339–349.
- [25] C.M. Ionescu, et al., Mathematical modelling with experimental validation of viscoelastic properties in non-Newtonian fluids, *Phil. Trans. Math. Phys. Eng. Sci.* 378 (2172) (2020), 20190284.
- [26] X. Cheng, et al., Imaging the microscopic structure of shear thinning and thickening colloidal suspensions, *Science* 333 (6047) (2011) 1276–1279.

### III. Observation de la couronne amphiphile en cryo-EM

Dans le cas d'études structurales, les échantillons purifiés sont ensuite soumis aux rayons X ou directement à un faisceau d'électrons afin d'en résoudre leur structure. Durant ma thèse, j'ai utilisé la cryo-EM pour résoudre différentes structures.

#### a. Généralités sur la cryo-EM

Trois méthodes sont utilisées pour résoudre la structure des protéines : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie aux rayons X (X-ray) et la cryo-EM. Chacune d'entre elles possède ses avantages et ses inconvénients (Figure 22). Certains d'entre eux sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. Concernant la cryo-EM en analyse de particules uniques (single particle analysis - SPA), les principaux points forts résident dans la préparation de l'échantillon. Elle ne nécessite pas l'obtention de cristaux et une faible quantité de protéine est requise.

RMN	X-ray	Cryo-EM
Protéine de petite taille : < 50 kDa	Trouver la bonne condition de cristallisation	Protéine > 50 kDa
Informations sur la dynamique de l'échantillon et les interactions intermoléculaires	Processus de cristallisation	Préparation de l'échantillon facile
		Observation des modifications post-traductionnelles
Requiert beaucoup de protéine (mg)	Pas de contraintes théoriques sur la taille de la protéine mais en pratique contrainte sur les gros complexes	Faible quantité de protéine nécessaire
		Observation de la variabilité de l'échantillon

Figure 22 : Quelques avantages et inconvénients de chacune des techniques de résolution de structure des protéines.

En 2017, Joachim Frank, Richard Henderson et Jacques Dubochet ont remporté le prix Nobel de Chimie pour leurs différents travaux ayant permis le développement de la cryo-EM. Les deux premiers se sont concentrés sur le traitement des données de façon à obtenir une reconstruction 3D à partir d'une image 2D alors que les travaux du français Jacques Dubochet ont porté sur le processus de vitrification cryogénique et le vide présent dans le microscope pour l'acquisition des données (Unwin et Henderson 1975) (Dubochet et al. 1988) (Henderson et al. 1990) (Frank et al. 1996).

Depuis ses débuts, le nombre de structures résolues par cryo-EM ne cesse de croître, notamment pour les gros complexes protéiques. Cette technique est en plein essor et le nombre de structures résolues grâce à elle et déposées dans la Protein Data Bank (PDB) est en constante augmentation (Figure 23).

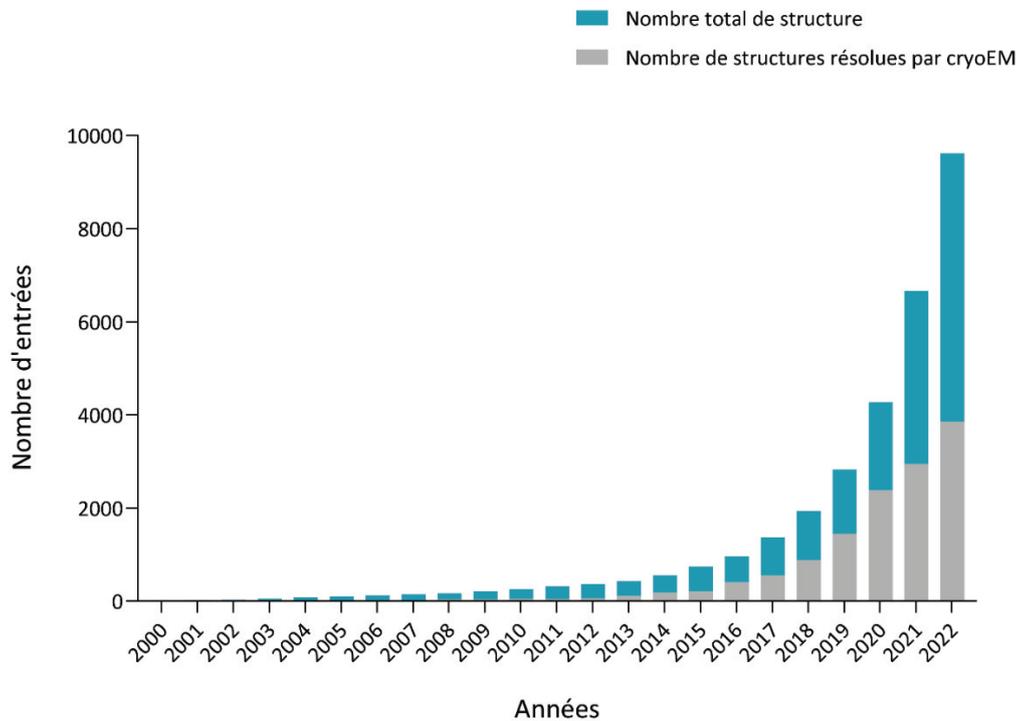


Figure 23 : Evolution croissante du nombre de structures résolues par cryo-EM depuis les années 2000 déposées dans la PDB

Comme illustré dans la Figure 24, la résolution d’une structure par cryo-EM demande 3 grandes étapes : une première qui consiste à préparer et congeler la grille, une deuxième durant laquelle les données sont collectées sur le microscope puis une dernière qui consiste à traiter les données collectées et qui aboutit à l’obtention du modèle.

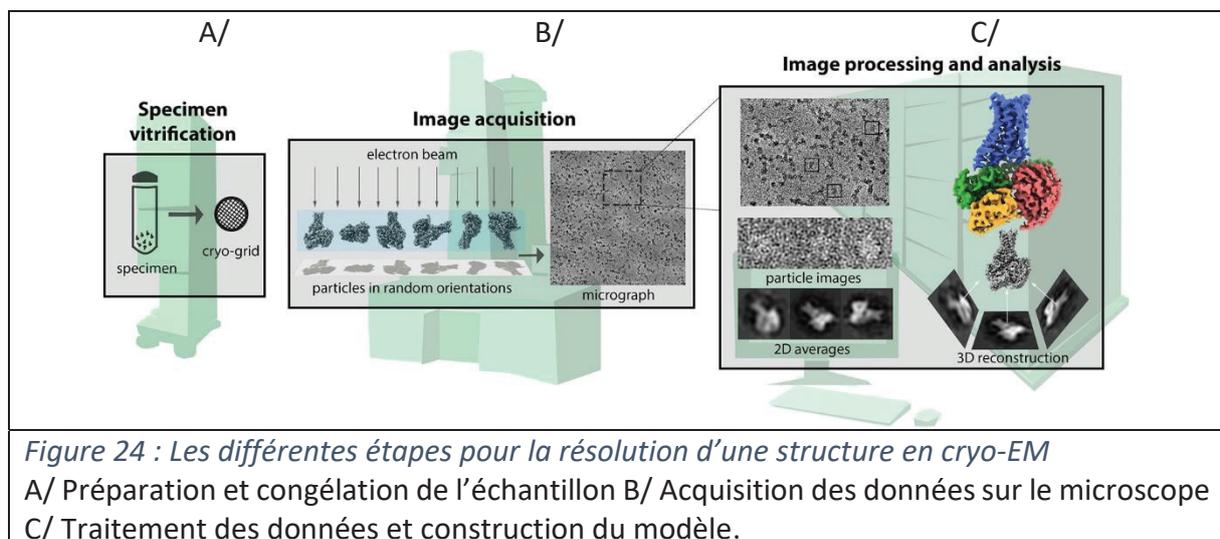


Figure 24 : Les différentes étapes pour la résolution d’une structure en cryo-EM  
 A/ Préparation et congélation de l’échantillon B/ Acquisition des données sur le microscope  
 C/ Traitement des données et construction du modèle.

L'obtention d'une carte à haute résolution demande plusieurs optimisations. Tout d'abord, elle nécessite un échantillon avec un haut degré d'homogénéité. La concentration de l'échantillon requiert également quelques mises au point. Elle est à ajuster selon l'environnement amphipathique utilisé. Les détergents nécessitent des concentrations plus élevées que les nanodisques ou les amphipols par exemple. Ceci s'explique par le pouvoir plus ou moins hydrophobe du solvant mais également du type de grille utilisé.

La préparation de la grille est une étape cruciale. Certains paramètres sont essentiels pour l'obtention d'une grille de bonne qualité. Tout d'abord, il est nécessaire d'hydrophiliser la grille (glow discharge). Cette étape consiste à rendre la surface de la grille hydrophile à l'aide d'un plasma, permettant un meilleur pouvoir mouillant et la diffusion des macromolécules dans les trous de la grille. Puis, la congélation de la grille dans l'éthane représente également une partie importante du processus. En effet, elle doit conduire à une vitrification rapide de l'échantillon hydraté sans formation de cristaux de glace. Ces derniers sont en effet très denses aux électrons et empêchent toutes observations. L'abaissement rapide de la température de l'échantillon à -170 °C environ engendre la formation d'une glace vitreuse idéale pour l'observation de l'échantillon. L'épaisseur de la glace formée sur la grille est également importante puisqu'elle peut avoir des conséquences au moment du traitement des données. Si la glace est trop épaisse, la grille n'est pas exploitable. Typiquement, une épaisseur de 50-100 nm est idéale. Enfin, il est nécessaire d'optimiser l'échantillon afin qu'il se distribue bien dans les trous, qu'il soit non agrégé, avec des particules denses mais séparées et dans toutes les orientations afin d'avoir une reconstruction 3D de qualité.

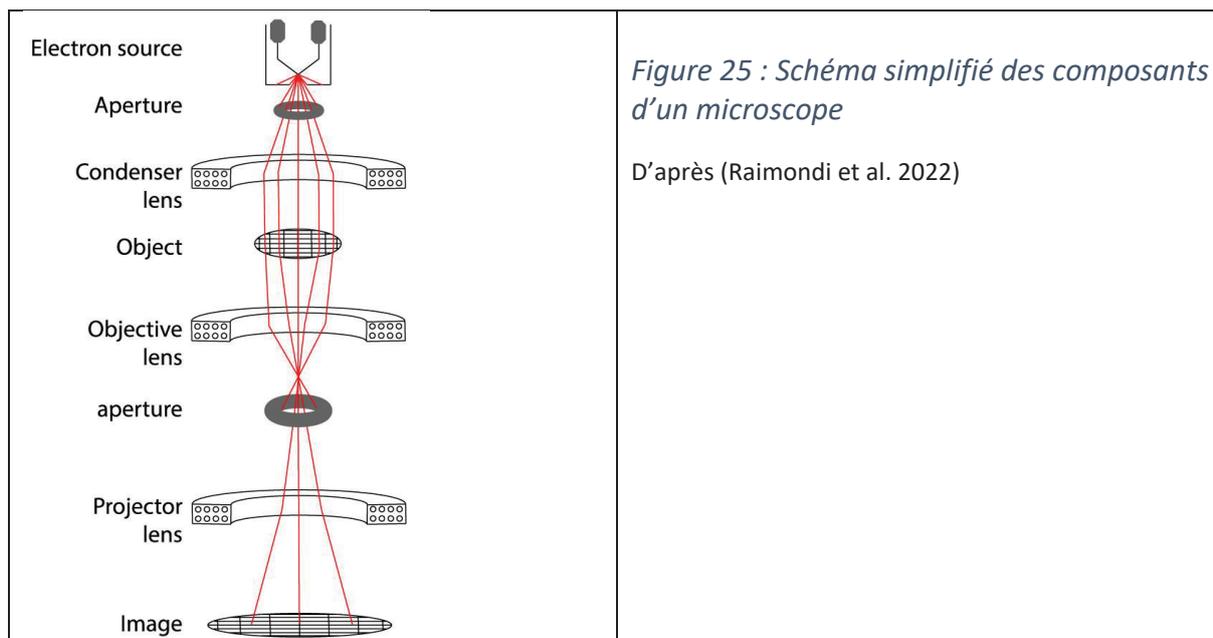
#### b. Le microscope en quelques mots

Un microscope électronique est composé de différents éléments qui ont pour but de former des images agrandies d'un échantillon biologique. Pour cela, un faisceau d'électrons est diffusé par l'échantillon observé puis les informations sont amplifiées par un ensemble de lentille et réceptionnées via un détecteur. Ci-dessous sont répertoriés les éléments principaux d'un microscope ainsi que leur fonction :

- Le canon à électron produit le faisceau d'électron. En cryo-EM, ils sont ensuite accélérés jusqu'à 200 ou 300 keV généralement, avant d'atteindre l'échantillon.
- Le système de lentilles électromagnétiques : un microscope possède plusieurs lentilles et autres composants annexes dont le rôle est de focaliser le faisceau électronique et corriger les imperfections du champ magnétique.
- Les détecteurs d'électrons : il en existe différentes sortes mais ils ont tous pour but de réceptionner les électrons diffusés par l'échantillon. La révolution de la résolution est venue avec l'apparition des détecteurs à détection directe d'électrons.

L'ensemble de ces éléments est contenu dans une colonne où le vide est réalisé grâce à un enchaînement de pompes.

L'ensemble des éléments sont représentés de façon schématique dans la Figure 25.



Le développement d'un tel outil a demandé de nombreuses mises au point et challenges à résoudre : Un faisceau d'électron étant très énergétique, il peut endommager l'échantillon. C'est pourquoi il y a une dose maximale à ne pas dépasser limitant ainsi le rapport signal/bruit. Pour pallier à cette limitation, il est nécessaire de collecter un nombre important d'images faiblement irradiées. En outre, placer un échantillon hydraté dans le vide conduirait à sa déshydratation. En conditions cryogéniques, ce problème est négligeable puisque l'échantillon est congelé.

### c. Traitement des données et construction du modèle

Sur la grille les protéines s'orientent de manière aléatoire. En analyse de particules isolées (SPA), le but du traitement des données est d'aligner les particules obtenues dans différentes orientations afin d'en résoudre la structure tridimensionnelle.

Dans un premier temps, il est nécessaire de corriger le mouvement des particules induit par les électrons. Le bombardement de l'échantillon par les électrons engendre des déplacements de celui-ci floutant les images. Le laboratoire de Niko Grigorieff a montré qu'il était possible d'enregistrer ces images sous forme de films (« movies ») permettant ainsi de ne pas perdre de signal (Campbell et al. 2012). Puis, une détection et sélection des particules dans chacune des images est réalisée. Des classes 2D sont ensuite créées par alignement des particules puis une reconstruction 3D est calculée. Différents affinements conduisent ensuite à la carte de densité de la protéine. L'objectif étant de trouver un ensemble de particules qui apportent des informations à haute résolution, sans engendrer trop de bruit. Pour une structure rigide, il est plus facile d'identifier ce petit ensemble de particule que pour les structures mobiles pour lesquelles il est, en revanche, nécessaire d'avoir plus de particules pour échantillonner toutes les conformations créant indéniablement plus de bruit dans la reconstruction. La résolution peut ainsi en être impactée.

Par ailleurs, plusieurs techniques d'affinement sont possibles pour atteindre des hautes résolutions générales ou locales sur des zones flexibles. On peut par exemple citer

l'affinement non-uniforme (logiciel cryoSPARC) qui est particulièrement adaptée aux petites protéines et protéines membranaires. Il tient spécialement compte des régions flexibles et non ordonnées des protéines contribuant ainsi à l'amélioration de l'alignement des particules. Un autre type d'affinement que j'ai couramment utilisé pour la résolution des structures présentées dans la 2<sup>ème</sup> partie du manuscrit est l'affinement hétérogène. Il permet de sous-classifier les particules dans des volumes choisis. Il permet d'avoir accès à des structures dont les différences sont plus subtiles. Aussi, il est possible de cibler une région sur laquelle on souhaite avoir un affinement plus précis. Pour cela il est nécessaire d'utiliser un masque qui correspond à une région de la protéine à affiner de façon plus ciblée, sur laquelle l'alignement des particules sera ciblé. Cet affinement plus localisé peut également être réalisé grâce à des affinements locaux disponibles. D'autres outils peuvent également être utilisés afin d'améliorer la qualité de la carte, la soustraction du signal, le doublement des particules, l'amélioration du contraste par exemple.

La résolution globale du jeu de données est estimée par la méthode des demi-cartes (half-maps) ; les particules sont séparées en deux groupes affinés séparément puis la comparaison de leur transformée de Fourier à un certain seuil (0,143 ou plus rarement 0,5) permet d'en estimer la résolution.

L'étape ultime consiste à construire le modèle à l'intérieur de la carte. Pour cela, différents outils sont disponibles comme Coot ou Isolve pour construire manuellement, et les logiciels des suites Phenix ou Ccp4 pour des affinements automatiques. Ils sont utilisables en « association » et permettent de construire un modèle au sein de ces cartes. Plusieurs paramètres sont ensuite vérifiés pour approuver la validité de la structure construite, notamment en vérifiant la stéréochimie. En fonction de la résolution, les constructions sont guidées soit majoritairement par les cartes soit plutôt par la stéréochimie.

Dans certain cas, les particules peuvent avoir une orientation préférentielle au sein de la grille. Cela peut être modulé en utilisant différents types de grilles. Par exemple, il est possible de recouvrir la grille avec une couche continue de graphène ou d'oxyde de graphène, ou encore changer la taille des trous qui peut être régulière ou bien aléatoire et ainsi apporter des orientations différentes dans la glace.

Plusieurs paramètres peuvent limiter la résolution. Tout d'abord, la flexibilité perturbe l'alignement et diminue ainsi la résolution globale de la carte de densité. Aussi, l'orientation préférentielle de certaines protéines sur la grille empêche d'obtenir toutes les vues possibles et diminue donc la résolution.

#### d. Les détergents en cryo-EM

L'étude des protéines membranaires en cryo-EM est d'autant plus compliquée que les détergents sont des objets supplémentaires qui jouent sur le contraste. Le type de détergent choisit n'est donc pas négligeable. C'est pourquoi ceux ayant une faible CMC sont à privilégier car ils sont présents en plus faible quantité dans l'échantillon et impactent alors moins le rapport signal/bruit. Par exemple, la digitonine a une partie polaire assez importante qui diffuse fortement les électrons (Thonghin et al. 2018).

Au sein du laboratoire, l'étude structurale de BmrA a initialement commencé par la cristallographie. C'est donc au moment de la recherche de conditions de cristallisation que l'optimisation des détergents pour la purification a été faite. Dans le but de favoriser les contacts cristallins, la quête était d'obtenir la plus petite micelle possible. Pour cela, l'ajout de cholate au DDM en quantité équimolaire (1:1) induit l'apparition d'une micelle plus petite que le DDM seul. Le cholate possède un nombre d'agrégation inférieur à celui du DDM (2-5 vs 78-149) (« Anatrice Maltosides » s. d.). L'augmentation de la quantité de cholate conduit alors à une diminution de la taille de la couronne de détergent.

Lorsque l'équipe s'est tournée vers la cryo-EM, les mêmes conditions ont été gardées et sont propices à l'obtention de structures à des résolutions satisfaisantes pour le monde des protéines membranaires. Nous avons tout de même essayé un rapport 3:1 DDM-cholate, car il stabilise la protéine, mais ne semble pas favorable en cryo-EM. Pour exemplifier mes propos, ci-dessous (Figure 26) se trouve deux micrographes de BmrA en DDM-cholate, un avec un rapport 1:1 et un deuxième avec un rapport 3:1.

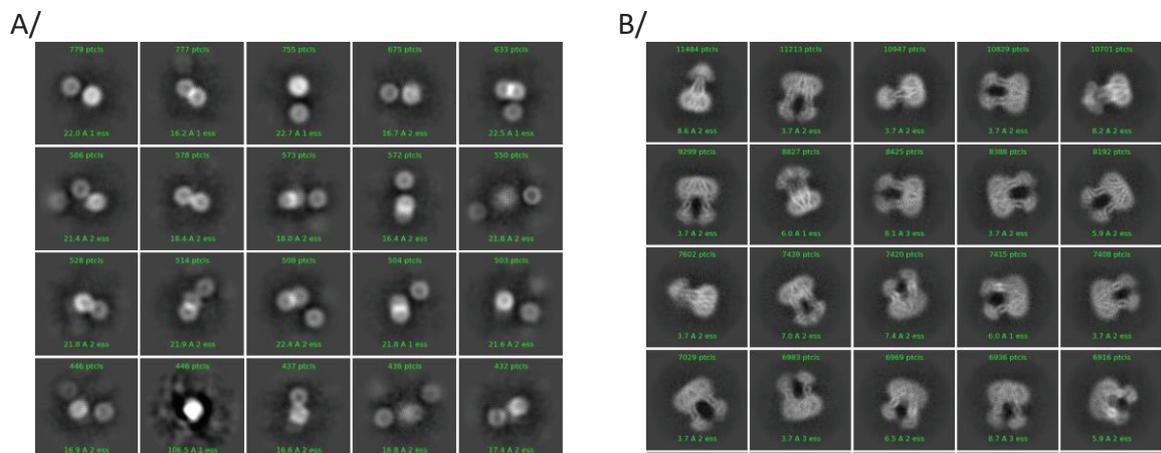


Figure 26 : Classification 2D de micelles de détergents ou de BmrA

A/Classes 2D de micelles de détergents DDM-cholate en rapport 3:1. Absence de structures secondaires et particules de petite tailles ( $\approx 50$  Å de diamètre).

B/ Classes 2D de BmrA en DDM-cholate 1:1 dans lesquelles on observe une forme typique de la protéine : hélices transmembranaires et couronne de détergent.

D'une manière générale, nos études montrent la modulation de la couronne de détergent et de son encombrement stérique. Comme il est possible de visualiser la couronne de détergent par cryo-EM, nous nous sommes posés la question de l'influence de celle-ci dans les reconstructions 3D par cryo-EM. En effet, il est bien établi que les détergents ou tout autre environnement hydrophobe utilisés sont mobiles et forment une couronne dynamique autour de la partie hydrophobe de la protéine d'intérêt. Or, en cryo-EM, la reconstruction 3D est basée sur l'alignement des particules, processus dans lequel la couronne de détergent peut représenter une part significative du signal, et donc intervenir dans l'alignement. La question était de savoir si ces environnements différents, qui possèdent des tailles différentes, des formes et des fluidités différentes entraînent des reconstructions 3D différentes. Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une étude statistique de la Protein Data Bank (PDB) où nous avons comparés les structures des protéines membranaires qui ont été résolues dans plusieurs environnements amphipathiques différents (nanodisques, amphipols et

détergents). Plusieurs familles de protéines ont ainsi été étudiées, comme les TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid), les GPCR (G Protein-Coupled Receptor) et celle des transporteurs ABC. Pour chaque reconstruction, nous avons mesuré la taille de la couronne et les avons comparées statistiquement selon le type de protéine, de détergent et d'environnement amphipathique.

#### e. Points majeurs de l'article

Afin de pouvoir conduire cette analyse de manière statistique et sûre, un préalable était de pouvoir mesurer les couronnes de manière fiable. Bien qu'à « l'œil » il soit évident de distinguer la partie de la protéine enchâssée dans la membrane et la ceinture de solvant amphipathique, être capable de la mesurer est un challenge. Par l'observation d'un grand nombre de reconstructions, nous avons tout d'abord pu établir les marqueurs de l'apparition de la ceinture amphipathique dans l'histogramme de densité. En utilisant ce guide pour normaliser toutes les mesures, nous avons ensuite mesurés 6 distances pour chaque protéine, entre la densité protéique et l'extrémité de la ceinture. Comme les reconstructions utilisent souvent la symétrie, celle-ci se traduit par des artefacts nettement visibles dans les cartes de densité, induisant des « creux et des bosses » dans la ceinture amphipathique. Il en résulte ainsi des distances « courtes » et « longues », respectivement, autour de la protéine. Pour prendre en compte ce phénomène, nous avons séparé les deux types de distance pour pouvoir les analyser séparément.

Une fois les distances identifiées, une analyse statistique a pu être conduite. Nous avons montré qu'indépendamment du type de composé formant la couronne et du type de protéine, il y a création d'une reconstruction 3D moyenne qui est similaire. Nous avons tout d'abord montré cela sur les protéines de la famille TRPV, qui ont été résolues en nanodisques, amphipols et détergents, et avec un nombre conséquent de structures pour obtenir un pouvoir statistique solide. Malheureusement, il n'existe pas beaucoup de protéine avec ce même choix mais nous avons tout de même pu inclure des GPCR et des transporteurs ABC. Ces protéines partagent le même repliement et avons ainsi supposé que l'environnement amphipathique influe de la même façon sur les reconstructions. Pour les GPCR résolues exclusivement en détergents, mais de natures différentes, aucune différence n'a pu être observée dans la taille des couronnes. Concernant les transporteurs ABC, il en est de même, aucune différence n'a été remarquée entre les couronnes de détergents et celles de nanodisques. Globalement, la taille de la couronne varie entre 14 et 36 Å autour de la protéine, quel que soit la reconstruction.

Il est important d'utiliser l'outil statistique pour répondre à cette question car il existe bel et bien des divergences entre chaque reconstruction, de par les différences de protocole, de microscopes, de logiciels et de manipulateurs. Le cas particulier du masque de la couronne de détergent s'est posé sur quelques reconstructions. Il apparaît que le signal de cette couronne s'étale sur l'ensemble des informations, il est impossible de le masquer complètement. La visualisation de la frontière de la couronne est toujours possible rendant faisable la prise des mesures.

En conclusion, nous avons pu établir que les cartes de densité obtenues en cryo-EM étant une moyenne, le caractère flexible et dynamique de l'environnement amphipathique entraîne une visualisation de la couronne qui correspond à un minimum commun du solvant amphipathique. La taille totale de ce dernier est donc supérieure à celle visualisée par cryo-EM.

La cryo-EM représente une réelle prouesse technique. Son développement a demandé de relever plusieurs défis. Tout d'abord, la représentation 3D d'un objet à partir de projections en deux dimensions n'est pas triviale et a donc demandé plusieurs années de développement. De plus, un échantillon hydraté placé dans le vide se déshydrate mais ce problème a été résolu en congelant l'échantillon à observer. Cependant, un problème majeur réside encore dans le faible rapport signal/bruit induit par l'endommagement de l'échantillon par le faisceau d'électrons.

Outre la résolution de la structure à haute résolution, la cryo-EM permet de nouvelles approches pour analyser la dynamique d'une protéine. L'isolation d'intermédiaires conformationnels reste compliquée puisqu'ils sont transitoires mais la performance des outils ne cessant d'être augmentée, il est maintenant possible d'améliorer la compréhension du mécanisme par analyse de la flexibilité.

- f. Publication 3 : Cryo-EM reconstructions of membrane proteins solved in several amphipathic solvents, nanodisc, amphipol and detergents, yield amphipatic belts of similar sizes corresponding to a common ordered solvent layer

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - Biomembranes

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamem](https://www.elsevier.com/locate/bbamem)

# CryoEM reconstructions of membrane proteins solved in several amphipathic solvents, nanodisc, amphipol and detergents, yield amphipathic belts of similar sizes corresponding to a common ordered solvent layer

Veronica Zampieri, Alexia Gobet, Xavier Robert, Pierre Falson, Vincent Chaptal \*

Molecular Microbiology and Structural Biochemistry Laboratory (CNRS UMR 5086), University of Lyon, IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Cryo-EM  
Membrane proteins  
Detergent belt  
Nanodisc  
Amphipols

## ABSTRACT

To maintain membrane proteins soluble in aqueous solution, amphipathic compounds are used to shield the hydrophobic patch of their membrane insertion, which forms a belt around the protein. This amphipathic belt is seldom looked at due to the difficulty to visualize it. Cryo-EM is now offering this possibility, where belts are visible in 3D reconstructions. We investigated membrane proteins solved in nanodiscs, amphipols or detergents to analyze whether the nature of the amphipathic compound influences the belt size in 3D reconstructions. We identified belt boundaries in map-density distributions and measured distances for every reconstruction. We showed that all the belts create on average similar reconstructions, whether they originate from the same protein, or from protein from different shapes and structures. There is no difference among detergents or types of nanodisc used. These observations illustrate that the belt observed in 3D reconstructions corresponds to the minimum ordered layer around membrane proteins.

## 1. Introduction

Membrane protein structure determination has taken a giant leap forward with the recent development of single particle electron microscopy in cryogenic conditions (Cryo-EM). Much more membrane protein structures become available [1,2] (SFig. 1) improving our knowledge of many biological processes. In order to achieve this goal of a nice quality structure, it is necessary to extract the protein from the native membrane, and purify it to homogeneity so it can be applied on a grid and imaged on a microscope. And there lies the specificity of membrane proteins: they display a part of their structure that spans the membrane, abundant in hydrophobic residues, rendering them insoluble in water. There is thus a need for some amphipathic compound to shield this trans-membrane region from water and from other hydrophobic molecule or even other proteins around, else the result will be aggregation and loss of the precious sample.

Many recipes are available today to maintain membrane proteins in solution. The historical way, still very much used today, is to use detergents to extract membrane proteins from the membrane and then purify them in detergent solutions. Detergents are small molecules that

display a hydrophilic head and a hydrophobic tail. Both moieties vary in nature, length and size allowing a large panel of possible screening for good conditions, and they are also sometimes used in mixtures [3]. By nature, detergents are very mobile and form a dynamic belt wrapping around the trans-membrane part of the protein [4]. Due to this dynamic property, detergents can have sometimes negative impacts on membrane proteins structure and function. Therefore, detergents with increased stabilizing properties have been more recently conceived for limiting such mobility either by having a design close to lipids (LMNG) [3,5–7] or by generating specific interactions [8]. Also, their amphipathic nature is unique to stabilize given conformations. For example, the well-studied Lactose permease from *E. coli* (LacY) has been proven to be stabilized in the outward-facing conformation when purified in LMNG, while being in an occluded or inward-facing conformation in DMNG or DDM [9].

Other tools have been developed to forgo the need for detergents. Among them the derivation of the lipid A apolipoprotein engineered as a series of Membrane Scaffold Proteins (MSP), that together with lipids and the membrane protein will form a lipidic nanodisc is a real success. It allows to reconstitute a more native environment and/or to vary the

\* Corresponding author.

E-mail address: [vincent.chaptal@ibcp.fr](mailto:vincent.chaptal@ibcp.fr) (V. Chaptal).<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183693>

Received 27 April 2021; Received in revised form 28 June 2021; Accepted 30 June 2021

Available online 13 July 2021

0005-2736/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

type of lipids around the membrane protein [10]. In the same vein, amphipols are polymers that wrap around purified membrane proteins and stabilize them without the need for detergents and lipids [11,12]. All these tools have been used for membrane protein structure determination by Cryo-EM. More recently, new polymers have been designed to directly extract membrane proteins from native membranes, allowing their purification without detergents [13]. Also, several types of “lipid nanodiscs” originating from proteins, peptides or polymers have been described [14–17]. All these tools present advantages and limitations in their use, with extensive literature on each specific case (for example [18,19]).

All these compounds generate a local amphipathic environment around the membrane region of membrane proteins that maintains them in aqueous solutions. This layer is a belt from which membrane proteins are indissociable. Importantly, all these environments bear intrinsic variability in size and shape as measured by various methods, alone or in complex with membrane proteins [18,20–22]. Also, some environments like detergents are thought to be more fluid and displaying intrinsic variability [4] than more rigid ones like amphipols, known to stabilize membrane proteins for example [13]. Nonetheless, this solvent belt is seldom looked at despite its huge influence on the protein function, due to the difficulty to visualize it. Cryo-EM now allows for the visualization of a layer wrapping around the transmembrane region of membrane proteins. We have taken this opportunity to investigate if there is an influence of these different amphipathic belts on their visualization after 3D reconstructions. We identified the position of the hydrophobic solvent belt in map-density distributions and measured the belts for many different proteins solved in nanodiscs, amphipols and detergents. We showed that all the belts create on average similar reconstructions, whether they originate from the same protein, or from protein from different shapes and structures. There is no difference among detergents or type of nanodisc used. These observations illustrate that the averaging procedure of CryoEM reconstructions returns a belt corresponding to a common minimum ordered solvent layer among all the membrane proteins particles selected for this reconstruction. This solvation layer is however smaller than the total amount of amphipathic compound embarked around membrane proteins.

## 2. Results

### 2.1. Selection and investigation of 3D reconstructions of membrane proteins structures solved by cryo-EM in several amphipathic belts

In order to discriminate whether there is an influence of the type of amphipathic belt on the 3D reconstructions used to image membrane proteins by cryo-EM, we have screened the whole Protein Data Bank to select for comparison the membrane proteins that have been solved only in multiple hydrophobic environments: nanodiscs, amphipols or detergents (Fig. 1A. and STable 1.). The idea behind this selection is to keep the protein fold constant in order to normalize its influence on the reconstruction, and to be able to focus on the solvent belts alone. For small membrane proteins like the ones selected in this study, transmembrane helices dominate the reconstructions [23]. These reconstructions for proteins of similar folds will thus not be affected by protein's local structural changes, and warrants evaluating the effect of amphipathic belts on reconstructions. The identification of the belt is obvious to a trained eye, capable of detecting the trans-membrane parts of a protein in a structure. The hydrophobic belt is characterized by an expansion of lower-level density in the vicinity of the membrane region as a decrease in the map density. After the observation of map-density distributions of each structure of this dataset, an apparent feature was observable to identify the belt and is exemplified in Fig. 1B. At high density levels, the very ordered parts of the structure are visible, on which reconstruction was anchored. Typically, trans-membrane helices are key features used in 3D reconstructions of membrane proteins and are visible at this level. With decreasing density levels, the number of

voxels increases with the map-density distribution curve showing a concave shape (level 0). The higher ordered layers of the belt start to appear when the curve becomes convex (level 1, dotted arrow). The belt becomes more and more apparent over the course of about one log when the curve inflexes concavely (level 2) before a sharp increase in number of voxels leading to appearance of low-level noise throughout the box (level 3). Across all reconstructions, it is apparent that the more visible the hydrophobic belt, the clearer and sharper the transition is between levels 1 and 2. Notably, the hydrophobic belt inflates further away from the trans-membrane region as the map density decreases (transition from level 1 to level 2 in SFig. 2), which denotes different accuracy of belt visualization during reconstructions. The further away from the protein, the less homogeneous the belt is during the 3D reconstruction across a particle dataset. We chose to measure distances at level 2 as it shows the full range of the belt (SFig. 3).

Importantly, most, if not all, published cryo-EM maps have been subjected to masking, and/or sharpening, and reconstructions could have been created with symmetry enforced, leading to slight distortions of the belt (STable 1). All these parameters, along with the type of software used, will have influence on the reconstruction and the size of the belt. Nevertheless, the final reconstruction is the one under scrutiny and subjected to analysis and comparison by outside investigators. With these restrictions in mind, the current analysis is still worth to get a grasp of amphipathic belt sizes across various reconstructions.

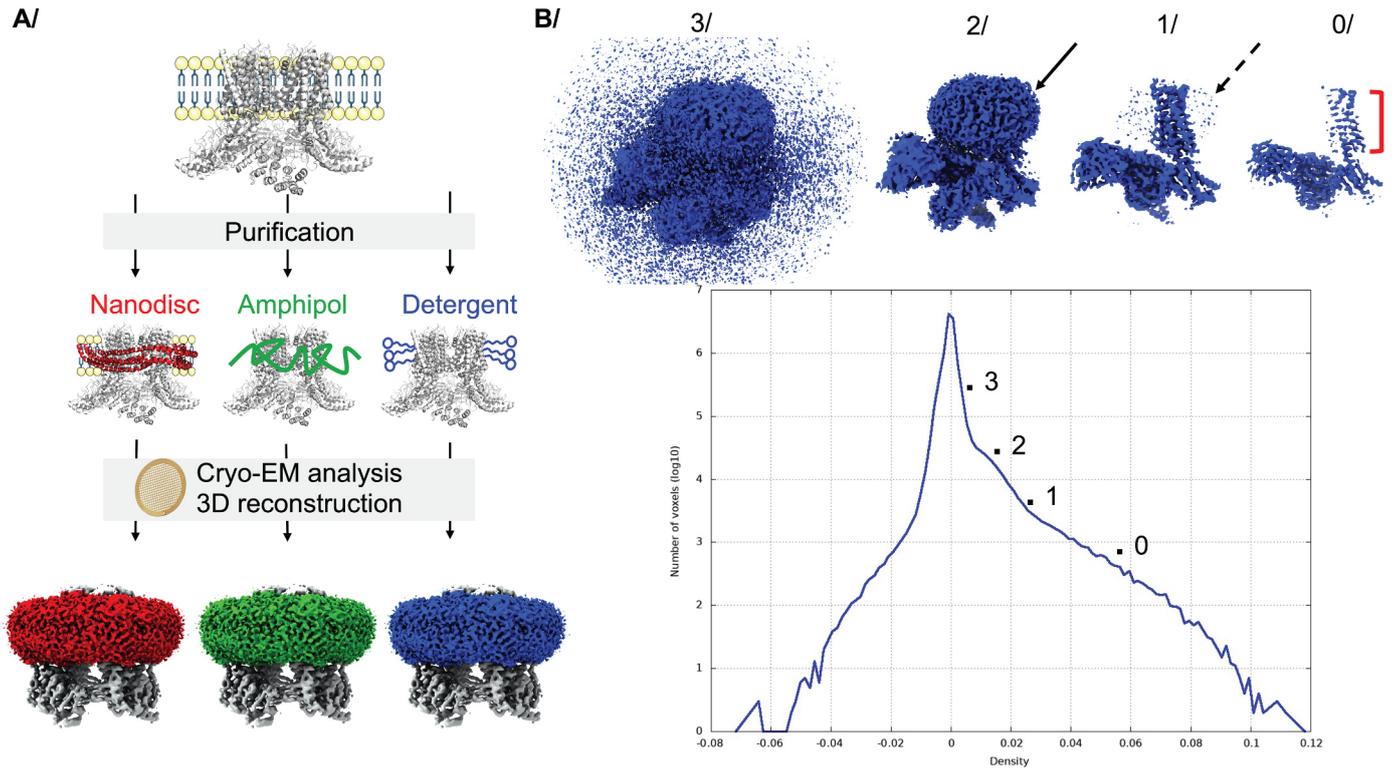
### 2.2. 3D reconstructions of membrane proteins in nanodiscs or detergents yield similar average belt sizes

Using the map-density histogram, we measured for each entry the belt size by determining the distance between the protein edge and the solvent boundaries at level 2 (SFIGs. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18., STable 2.). Belt reconstructions are not completely spherical but rather follow the protein shape. We could thus identify long and short distances of the hydrophobic solvent belt, which we separated in two categories for further processing. Fig. 2 displays the distance distribution plot of all proteins separated by hydrophobic environments: nanodiscs, amphipols and detergents. For each type of belt, there is an apparent spread of distances, with 95% of total distances comprised between 14 and 36 Å, and no distances below 10 Å around the protein. Statistical analysis of long distances observed in detergents and nanodiscs show that they follow the same distribution, as well as small distances for these two categories. Considering the means for these two categories of amphipathic compound, the solvent belt is visible around the protein for 21 to 28 Å. The smaller number of structures solved using amphipols precludes the statistical analysis on means using parametric statistics. Non-parametric statistics on ranks reveals first an ambiguity about long amphipol distances where the current data set cannot distinguish whether the distances are different or similar to the nanodiscs or detergents ones (more measurements on more structures are needed to solve the debate). Second, it unambiguously states that short distances measured in amphipols follow the same distribution as the nanodiscs or detergents ones. Put together, these results point to a common average distance distribution of solvent belts surrounding membrane proteins observed after 3D reconstruction of cryo-EM data.

In order to distinguish if there is some inter-family of inter-solvent specificities hidden within the global distribution, we further separated proteins for individual analysis.

### 2.3. The TRPV family

The Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) family consists of six ion channels, varying in ion-selectivity according to the sub-family. Despite being functionally distinct, they share a highly conserved fold, being active as a tetramer formed around 6 trans-membrane helices per monomer [24]. In the present dataset, we identified structures of TRPV1 in nanodiscs and amphipols, TRPV2 in nanodiscs, amphipols and



**Fig. 1.** Visualization of the different types of hydrophobic belts surrounding membrane proteins. A/ General scheme of membrane protein purification from the membrane, kept in detergent (blue) or reconstituted in nanodisc (red) or amphipol (green), and imaged by cryo-EM to obtain a 3D reconstruction. The channel TRPV1 is used as an example of reconstruction (EMD-8117, PDB:5lrx), with belts colored accordingly. B/ Typical map-density distribution and representative density levels of reconstructions, using the muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complex as an example (EMD-20079, PDB:6oik). Level 0 corresponds to parts of the structure with strong density; the red bar shows the trans-membrane domain. Level 1 corresponds to the appearance of high density for the belt, depicted by the dotted arrow. Level 2 represents the maximum density observed at low-level density, depicted by the solid arrow. Level 3 corresponds to low density noise. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

detergents (LMNG and DMNG), TRPV3 in Nanodiscs, detergents and MSA-derived lipidic nanodiscs, and TRPV5 in nanodiscs and DMNG (STable 1.). The fact that TRPV proteins share a conserved fold gives a unique opportunity to compare varying hydrophobic solvent belts. To these proteins, we also included structures of TRPV6 that were solved only in amphipols, benefiting from the fact that they share the same fold.

The signal of the hydrophobic belt varies in intensity among the different 3D reconstructions, for unclear reasons (Fig. 3A., S Figs. 4, 5, 6, 7.). For example, the nanodisc belt of TRPV1 and 2 appears with a strong signal in these five reconstructions, while its intensity is much milder in the two reconstructions of TRPV5. Similar trends can be seen in amphipols or detergents across the various reconstructions. Nevertheless, belt boundaries are clearly visible and were measured for all thirty proteins (Fig. 3B, C.) Distance distributions follow a similar trend as the global one (Fig. 2A.), where differences among belts are undistinguishable. The same ambiguity remains between long distances of nanodiscs and amphipols, but it is challenged by the lack of difference this time between amphipols and detergents. More measures on more reconstructions would help to differentiate the trend. Nevertheless, the fact that short distances show the same distributions across the three types of solvent and the undistinguishable long distances for nanodiscs and detergents suggest a similar average size for solvent belts around TRPV proteins.

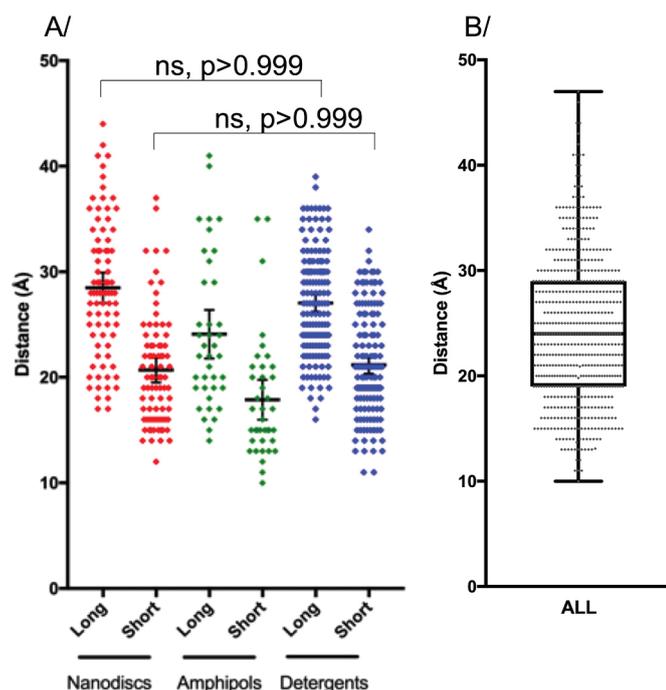
#### 2.4. Similar average belts length across multiple protein types solved using different amphipathic solvents

We have identified in the dataset multiple protein structures that have been solved only a few times in different hydrophobic belts. This limited number of structures prevents a statistical analysis on each

protein. Instead, these proteins were evaluated in a group, thereby offering the opportunity to compare proteins with completely distinct folds, and originating from various sources and amphipathic environments (Fig. 4., STable 1., S Figs. 8, 9, 10, 11, 12, 13.). Within each protein, the hydrophobic belt distances cluster rather well, showing a narrow distribution of distances, sampling apparently randomly across the distribution of all proteins shown in Fig. 2. Comparison of all these proteins reveals that their means group in similar ranges, with overlapping confidence interval of the mean, invoking a comparable hydrophobic belt around all these proteins.

#### 2.5. The superfamily of ABC transporters

ATP-binding Cassette (ABC) transporters are a large superfamily of transporters, harnessing the energy of ATP-binding and hydrolysis to translocate a wide range of substrate across many biological membranes. They are ubiquitous, and involved in many important cell-homeostasis functions [25]. While no single ABC transporter has been solved by cryo-EM in different hydrophobic environment, these proteins display a common fold and all together have been solved in nanodiscs, amphipols and detergents. They also offer the advantage that there is a large amount of structures, solved by several groups around the world using their own methodologies, and that their structures have been solved in multiple conformations offering a unique view of the solvent distribution around proteins in motion. Type I (or Type-V exporter, ABCB1-like) and type II (or Type-VI exporter, ABCG2-like) have been separated for clearer analysis (Fig. 5A, B, S Figs. 14–16.). Within the type I, no difference is detected between the distance distributions. Between type I and II, the distances are also inseparable, claiming that the hydrophobic belt around ABC transporters is always of similar size,



**Fig. 2.** Distance distributions between the protein edge and the belt boundary. A/ Distances separated by type of solvent. Nanodiscs (red), amphipols (green) and detergents (blue). Each dot corresponds to a distance, the horizontal bar is the mean with the error bar displaying the 95% confidence interval of the mean (reported in brackets below). Long and short distances are separated for clarity. Nanodiscs, long 28 Å [27–30] and short 21 Å [20–22]. Amphipols, long 24 Å [22–26] and short 18 Å [16–20]. Detergents, long 27 Å [26–28] and short 21 Å [20–22]. B/ All distances represented by a grey dot. The box corresponds to the 25th (19 Å) and 75th (29 Å) percentile with an equal mean and median of 24 Å. 95% of total distances are comprised between 14 and 36 Å. *P*-values displayed are derived from an ANOVA test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

regardless of the conformation or the arrangement of trans-membrane helices.

## 2.6. Similar detergent belt reconstructions around GPCRs

Twenty one unique structures of GPCR were found in the present database, belonging to the A, B, C or F classes (or G, R, F or S, respectively, according to the GRAFS nomenclature [26]), all solved in detergents. The vast majority used LMNG as a base, alone or in combination with other cholesterol-like detergents such as CHS, GDN or digitonin. All structures have been solved in complex with their cognate G proteins, and/or  $\beta$ -arrestin, in various flavors. Like for ABC transporters, all these GPCR structures share an overall fold that grants the direct comparison of their associated belts, with local differences between structures making it more worthwhile to analyze differences in the detergent belt measurements. The detergent belt distance distribution (Fig. 5., S Figs. 17–18.) is inseparable from the ABC transporter ones, or from the global distance distribution of all membrane proteins solved by cryo-EM (Fig. 2.). Following this trend, the popular detergent mixes, for these GPCR structures, between LMNG and CHS, GDN or digitonin yield similar detergent belt reconstructions, on average.

## 2.7. Different types of nanodiscs yield similar reconstructions; detergent belts are all of equivalent sizes

We checked whether a difference in distance distribution can be observed among the type of hydrophobic solvent. For instance, different flavors of Membrane Scaffold Proteins (MSP) are available to form

nanodiscs, varying the length of a helical fragment within the MSP to make it longer or shorter [10]. In the current dataset, proteins have been solved with 3 types of MSP, the short MSP1D1 and its longest version MSP1E3D1 comprising 3 helical insertion. MSP2N2 is formed by the fusion of two MSP1D1. Fig. 6A shows the distance distribution of the nanodisc belts sorted by nanodisc type, revealing that they are undistinguishable after reconstruction. Long and short distances of two types of nanodiscs formed by MSP1D1 and MSP2N2 follow the same distribution, with means equivalent to the mean obtained for all measurements in Fig. 2. Following this observation, distances were also separated by type of detergent to distinguish if a detergent or a detergent mixture can give rise to distinct belt sizes (Fig. 6B). Distances measured from different types of detergents are all virtually indissociable, and distribute in the same range as distances observed for nanodiscs and all other measurements together (Fig. 2.).

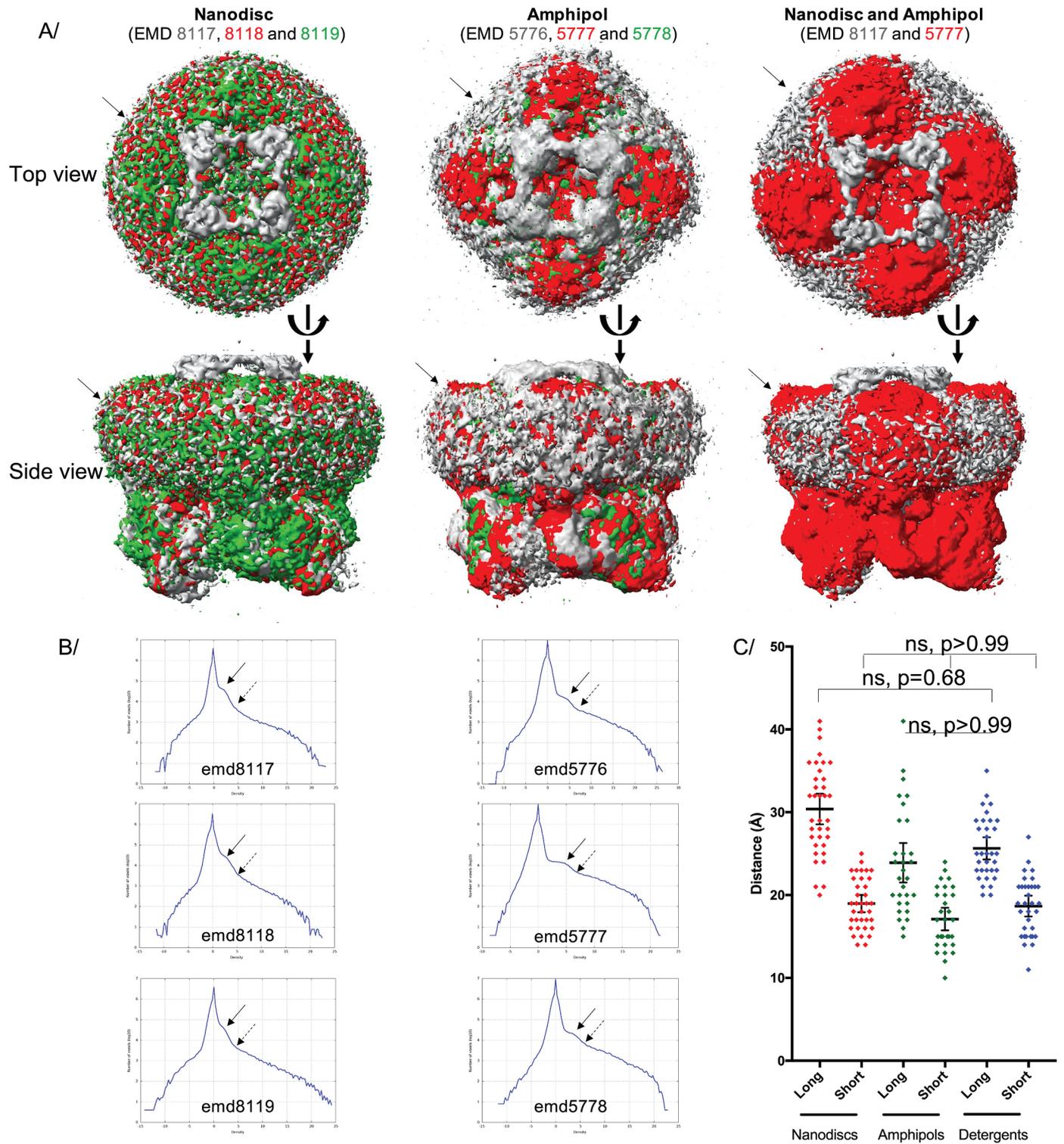
## 3. Discussion

In order to discriminate if the compounds used to shield the membrane region of a membrane proteins have an influence on the observation of the corresponding belt by cryo-EM, we performed a statistical analysis of a curated database of selected membrane proteins solved in several hydrophobic environments. By visualizing every structure, we were able to identify in map-density distributions a signature of hydrophobic belt appearance (levels 1 & 2 in Fig. 1B.). We further identified its boundaries for every protein and measured its size for statistical analysis. 95% of all measured lengths distribute between 14 and 36 Å around the surface of trans-membrane segments, and half of the belts are comprised between 19 and 29 Å. Importantly, the distance distribution of amphipathic solvent belts varies significantly within the current data set, which is why the use of statistical tools to evaluate differences between populations is so important. We also only focused on protein from the same family to diminish the impact of proteins on reconstructions. It should be noted that the shape of the membrane protein, or the presence of a protein-protein complex, will have an influence on the reconstruction (which part of the particle dominate the reconstruction [23]), which will have an impact on the size of amphipathic belts, and can be seen as exceptions.

The hydrophobic belts were further separated by type of solvent to probe whether nanodiscs, amphipols or detergents can yield tighter or larger belts. The results presented in Fig. 2 show that these three types of solvent were following the same distributions, and were therefore statistically indistinguishable on average.

This result correlates well with other types of measurements of the same solvents by other methods. Molecular dynamics simulations of membrane proteins embedded in amphipols or detergents show a belt around the transmembrane regions, with some degree of flexibility [4,27–29]. Indeed, the belt formed by these amphipathic compounds is very fluid, revealing local clusters of individual molecules, forming and deforming with time. When measured using neutron diffraction of membrane protein crystals [30], an averaging technique like cryo-EM, the detergent belt appears as a homogeneous belt around the protein. The size of the belt observed was then highly dependent on the type of crystal as the detergent could merge between belts of symmetric molecules [31]. All these techniques have been limited to the size of the system for molecular dynamic simulations, or “neutron-diffraction quality” crystals combined with deuterated detergents; here, cryo-EM allows for the visualization of any amphipathic compound, with belt measurements matching other measuring methods.

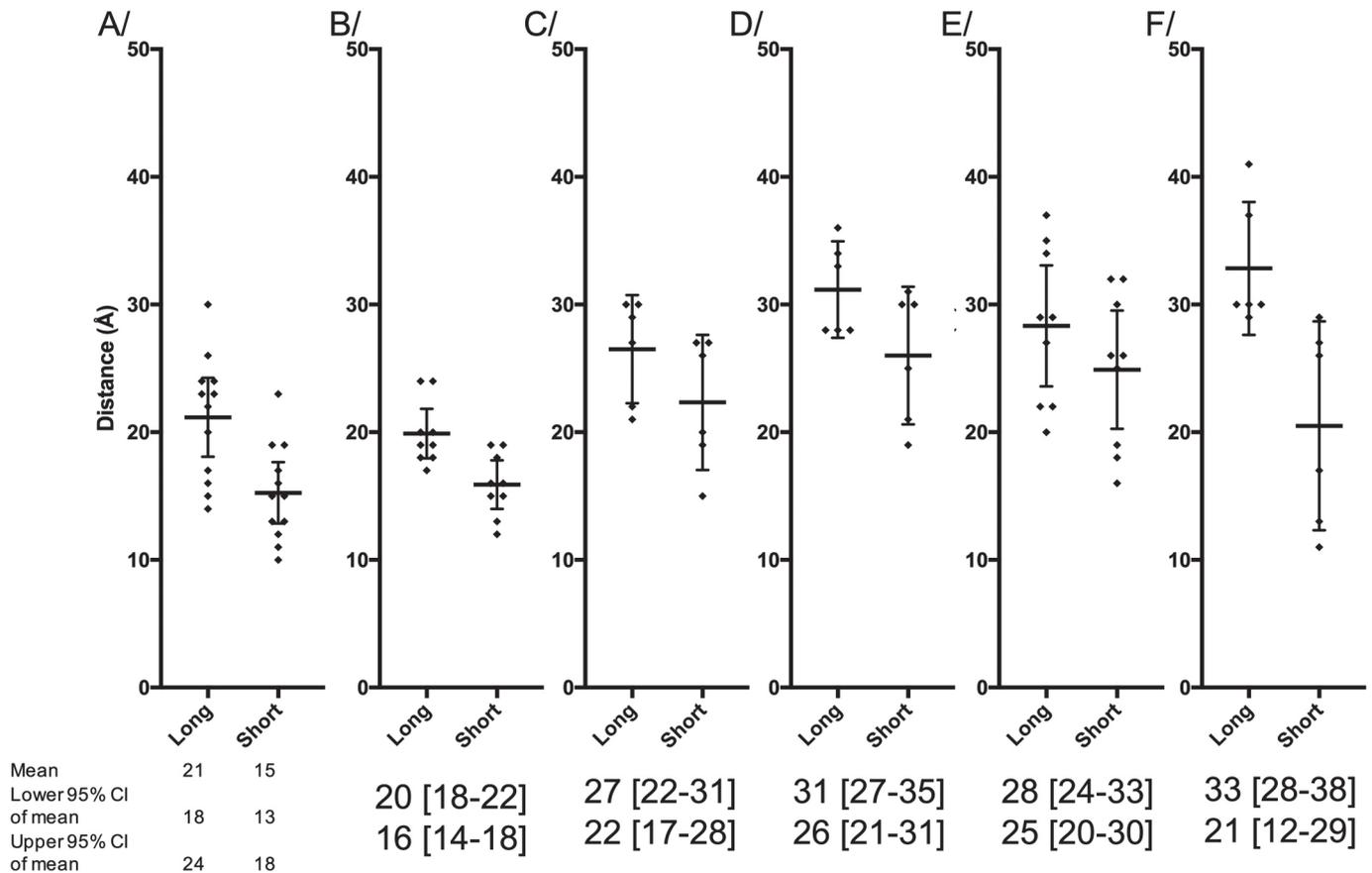
Since the hydrophobic belt has intrinsic properties to diffract electrons, it has a strong influence on the reconstructions. For example, for a 130 kDa ABC transporter, the DDM belt (400 monomers) accounts for an additional 200 kDa [4]. It is thus understandable that even if this detergent belt is not ordered, it still influences electron diffraction around the membrane protein, nicely exemplified with 3D variability of the detergent belt visualized in cryo-EM [32].



**Fig. 3.** Belts surrounding TRPV proteins. **A/** Example of the TRPV1 proteins solved in nanodisc or amphipols. The EMD accession codes are listed and each structure and are colored in grey, red or green, and overlaid. Top and side views are depicted, the solid arrow points to the position of the solvent belt. **B/** Map-density distribution for each entry. On each distribution, the dotted arrow shows the belt appearance at level 1, and the solid arrow at level 2. **C/** Distance distributions for all TRPV proteins, with the same colour-coding as Fig. 2. Statistical analysis was carried out using ANOVA and Kruskal-Wallis. Printed  $p$ -values are derived from Kruskal-Wallis analysis on ranks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Nanodiscs formation is achieved by mixing three ingredients (Membrane Scaffold Protein, lipids and membrane protein) and detergents removed using biobeads [10]. The membrane protein embedded into nanodiscs are then separated from empty nanodiscs using affinity chromatography and/or size exclusion chromatography.

The object comprising the membrane protein of interest is in reality quite heterogeneous, containing a mixture of large and small nanodiscs, with more or less lipids embarked, and varying in all dimensions according to the type of MSP used and the ratio lipid:MSP, etc... [33–36]. In some cases, contacts are made between the protein and the MSP that



**Fig. 4.** Distance distributions between the protein edge and the belt boundary for several types of proteins. Given the limited number of structures in each family, nanodiscs, amphipols and detergents have been reported together. Each dot corresponds to a distance, the horizontal bar is the mean with the error bar displaying the 95% confidence interval of the mean (also in brackets below). Long and short distances are separated for clarity. A/ PDK-TRP family, long 21 Å [18–24] and short 15 Å [13–18]. B/ V-ATPase, long 20 Å [18–22] and short 16 Å [14–18]. C/ OTP3, long 27 Å [22–31] and short 22 Å [17–28]. D/ OSCA, long 31 Å [27–35] and short 26 Å [21–31]. E/ LRRC8A, long 28 Å [24–33] and short 25 Å [20–30]. F/ TMEM16, long 33 Å [28–38] and short 21 Å [12–29].

stabilize it and makes the MSP visible in 3D reconstruction, as exemplified recently [37,38]. Most of the time however, the embarked membrane protein can move from side to side within the nanodisc, and does not always stay in the middle. The absence of a stable position makes it hard to visualize MSP positions by cryo-EM.

We next explored if we could identify within a set of protein, or type of amphipathic compound, a combination that could influence the size of the solvent belt seen around membrane proteins. We could not establish any significant difference in the measurement distributions, all falling within the overall distribution described in Fig. 2. Hereabouts, the incorporation of ABC transporters and GPCRs in this dataset yields an important viewpoint. From detergent quantification we know that the amount of detergent present around membrane proteins is directly proportional to the accessible hydrophobic area [4]. The amount of detergent around ABC transporters (12 trans-membrane helices) is thus inherently larger than the one around GPCRs (7 trans-membrane helices). One would thus expect to visualize a larger belt around ABC transporters by cryo-EM, but the size of the belt is on the contrary following the same distribution (Fig. 5).

Finally, there is the observation that the solvent belt observed around membrane proteins by cryo-EM is circular, somewhat reminiscent of the ones observed by neutron diffraction of crystals. This is partly due to symmetries enforced during reconstructions, but at the heart, mostly due to particle averaging. Particle alignments are anchored on secondary structures, among which trans-membrane helices are a lighthouse in a fog of amphipathic solvent. The solvent observed during reconstruction is thus made out of several layers distributing radially away from the protein boundary (Fig. 7). Such behavior is enhanced

when symmetry is applied, as can be seen on S Figs. 4 or 6 for example, where the belt follow the protein edge exactly with sharp edges that are not physiological, but are the results of symmetry enforced reconstructions. The higher the symmetry, the more pronounced the effect will be on reconstructions of amphipathic belts. Level 1 corresponds to the highest density, and represents the common minimum ordered layer, where the amphipathic compound is always present around the membrane protein. This layer concomitantly increases in size and decreases in density as it radiates away from the protein boundary, representing areas of space less and less populated by the solvent. This is influenced by the fluid properties of the solvent, as the sample is vitrified in liquid ethane. Each individual particle of a dataset represents a snapshot carrying its own belt-distribution. These observations reinforce the idea that the belt visualized by cryo-EM is a fraction of the volume occupied by the hydrophobic belt and represents the common minimum ordered solvent surrounding the protein. The present study aims at bringing this awareness on the interpretation of biochemical data in the light of cryo-EM 3D reconstructions.

## 4. Material and methods

### 4.1. Membrane proteins structure database extraction

Based on the mpstruc database (<https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) that lists all the membrane proteins of known 3D structure, we created a dataset containing only entries solved by Cryo-EM, as of January 17th, 2020. We wrote a Bash shell script in order to automatically extract information from these entries. This allowed us to

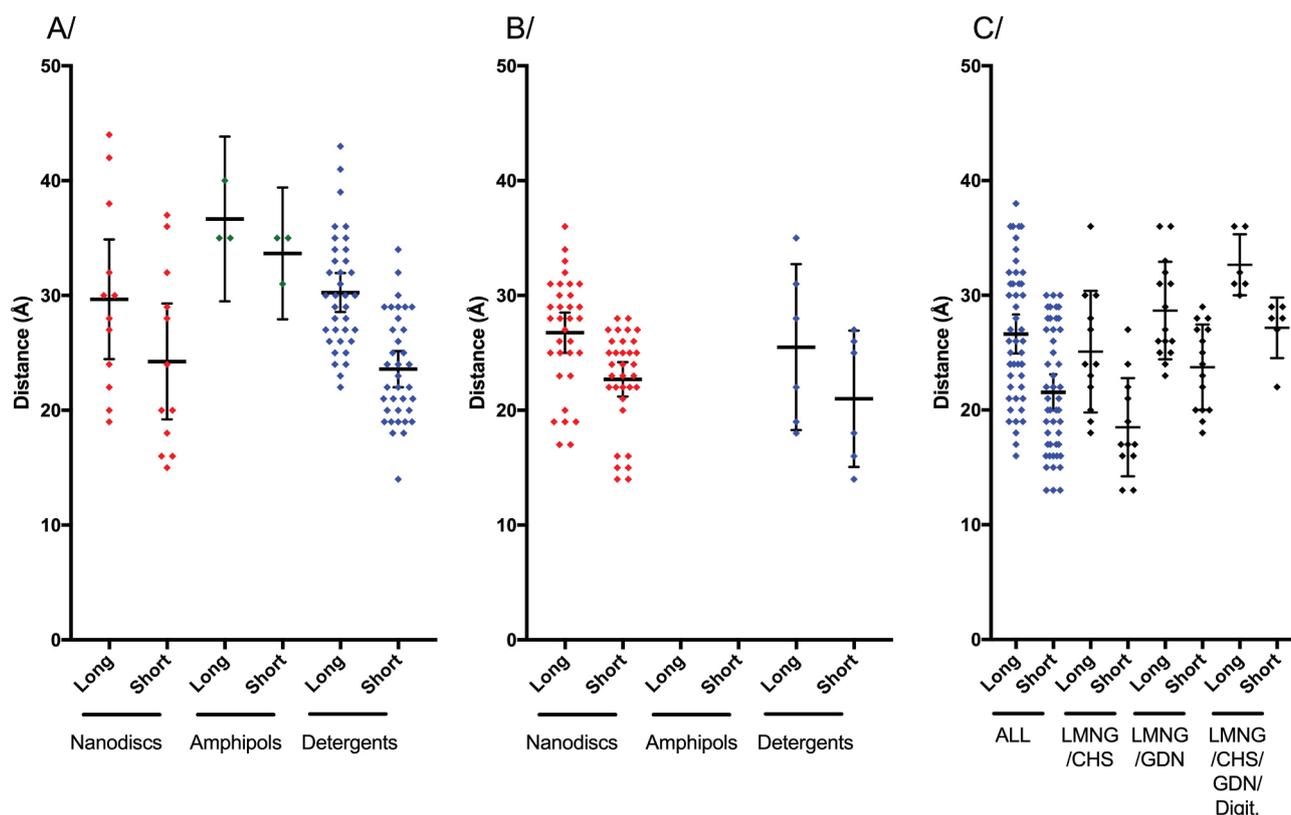


Fig. 5. Distance distributions around ABC transporters and GPCRs. A/ Type V ABC transporter (ABCB1-like). Nanodiscs, long 30 Å [24–35] and short 25 Å [19–29]. Amphipols, long 37 Å [29–44] and short 34 Å [28–39]. Detergents, long 30 Å [29–32] and short 24 Å [22–25]. B/ Type VI ABC transporter (ABCG2-like). Nanodiscs, long 27 Å [25–28] and short 23 Å [21–24]. Detergents, long 26 Å [18–33] and short 21 Å [15–27]. C/ GPCR, all structures, in detergents: long 27 Å [25–28] and short 22 Å [20–23]. For structures solved in the mixture LMNG/CHS: long 25 Å [22–29] and short 19 Å [16–21]; LMNG/GDN: long 29 Å [26–31] and short 24 Å [22–26], and for the complex mixture of LMNG/CHS/GDN with or without digitonin: long 33 Å [30–36] and short 27 Å [24–30].

determine those which have been solved in multiple hydrophobic environments (nanodiscs, amphipols or detergents) and to sort them in distinct subsets. Then, for each entry, we extracted from the Electron Microscopy Data Bank (EMDB) the map-density distribution data in order to render graphs plotting the density distribution (i.e. the number of voxels as a function of the density).

In order to create the graph of membrane structure determination by method over the years, a local copy of the RCSB Protein Data Bank (PDB) was parsed over each entry to extract the REVDAT record giving us their deposition years, as well as the EXPDATA record identifying the experimental technique used to solve the structure. This dataset was crossed with the above mpstruct database. Data were then classified in four groups of techniques (X-ray diffraction, Cryo-EM, liquid NMR and solid-state NMR) and numbered according to the deposition year.

#### 4.2. Map comparison

Maps were retrieved from EMDB and opened in ChimeraX [39]. Maps were first manually aligned, then aligned using the volume tool within ChimeraX. Threshold levels to compare the maps were adjusted to include the highest level of low contour information (level 2 in Fig. 1B), without including noise voxels appearing in the box.

#### 4.3. Measures of the solvent belt around the protein

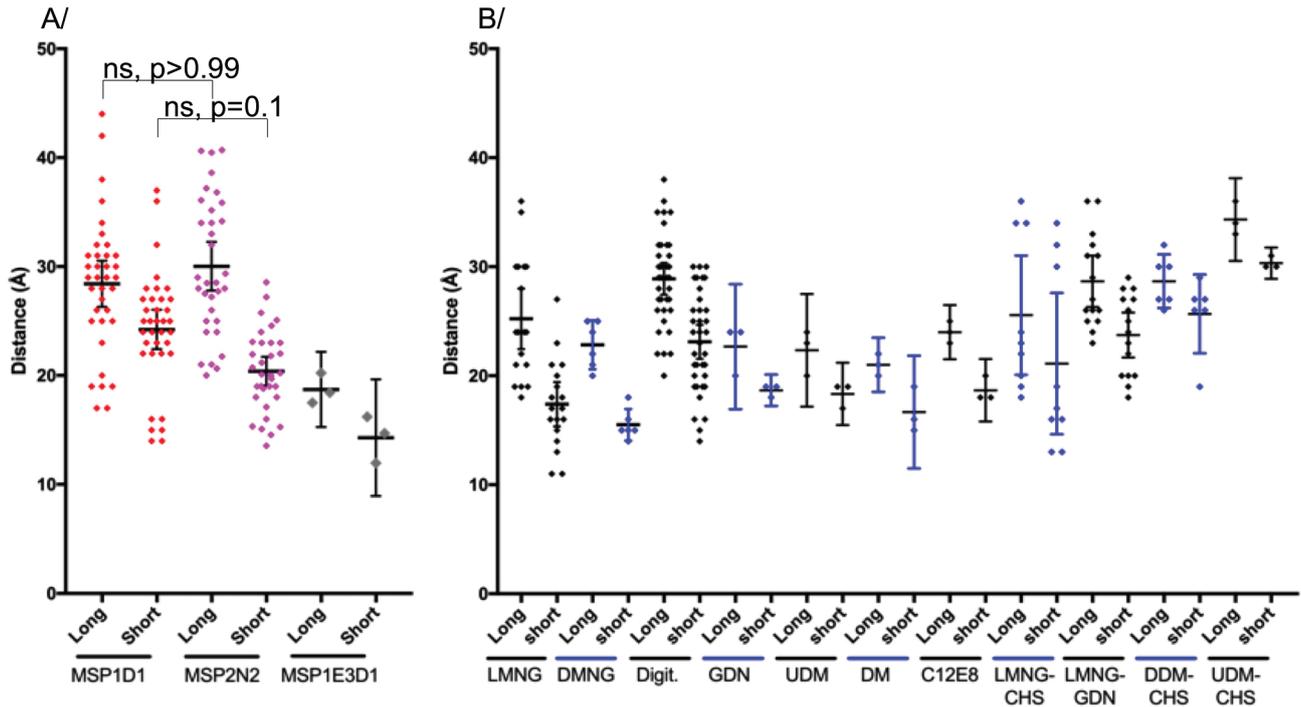
The measure of solvent belt thickness was performed in ChimeraX using the tool “tape” which is included in the software. The density map histogram was used to increase or decrease the contour information. Level 1 and 2 were manually chosen upon map and map-histogram inspection. At first, the density map showed the maximum of the solvent

belt information (Level 2) and vertical lines were drawn to signal the limit the solvent belt. Then the density map contour was reduced in order to see clearly the protein density (Level 0). Horizontal lines were drawn to link the vertical lines and the protein density. The tape tool measured the distance (SFig. 2). This experiment was performed six times and in distinct positions of the solvent belt. Note that low-pass filtering of maps yields a clearer and sharper edge for the amphipathic belt, that could be useful for measurement. A major drawback of these maps is the absence of noise that makes it impossible to distinguish when to stop the map contour level, and would result in inconsistent measurements across the dataset (SFig 3). All measurements were therefore conducted on non-filtered maps.

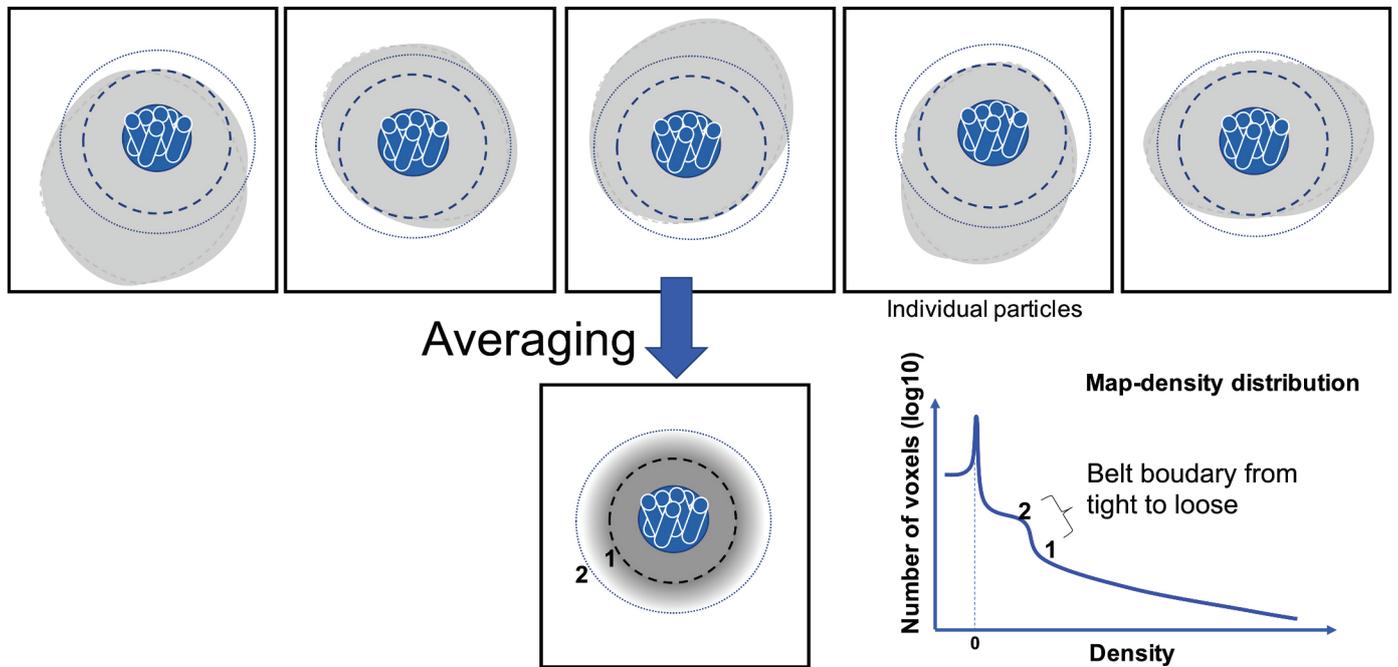
All structures from which measurements were derived are listed in STable1 and measurements are presented in STable2. For example, 12 TRPV proteins in nanodiscs were included in the study, for which 3 measurements were carried out, making a total of 36 data points shown in Fig. 3C.

#### 4.4. Statistical analysis

Statistical analysis (Prism.v7.2) was performed only when the amount of measures was sufficient to perform meaningful statistics. For this reason, some measures in amphipols or on individual types of proteins or hydrophobic environments were excluded. ANOVA was used to distinguish differences between means, and Kruskal-Wallis was used to distinguish differences on ranks. For all figures, means were computed as well as the 95% confidence interval of the mean. Statistics are very useful to distinguish differences within distributions, especially when, as it is the case in this manuscript, data overlap. Statistics are thus used to differentiate whether distributions are undifferentiable or different.



**Fig. 6.** Distance distributions of the different nanodiscs or detergent belts. A/ Distances measured for nanodiscs belts. MSP1D1, long 28 Å [26–31] and short 24 Å [22–26]. MSP2N2, long 32 Å [30–35] and short 20 Å [18–22]. MSP1E3D1, long 19 Å [15–22] and short 14 Å [9–20]. B/ Distances measured for the most represented detergents in this dataset. LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol), long 25 Å [22–28] and short 17 Å [15–19]. DMNG (Decyl Maltose Neopentyl Glycol), long 23 Å [20–25] and short 16 Å [14–18]. Digit. (Digitonin), long 29 Å [27–30] and short 23 Å [22–25]. GDN (Glyco-diosgenin), long 23 Å [17–28] and short 19 Å [17–20]. UDM (Undecyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), long 22 Å [17–28] and short 18 Å [15–21]. DM (Decyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), long 21 Å [19–24] and short 17 Å [12–22]. C12E8 (Octaethylene Glycol Monododecyl Ether), long 24 Å [22–27] and short 19 Å [16–22]. LMNG-ChS (ChS: Cholesteryl-hemisuccinate), long 26 Å [20–31] and short 21 Å [15–28]. LMNG-GDN, long 29 Å [26–31] and short 24 Å [22–26]. DDM-ChS (DDM: Dodecyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), long 29 Å [26–31] and short 26 Å [22–29]. UDM-ChS, long 34 Å [31–38] and short 30 Å [29–32]. Numbers are the mean followed by the 95% confidence interval of the mean in brackets. Statistical analysis was carried out using ANOVA and Kruskal-Wallis. Printed *p*-values are derived from Kruskal-Wallis analysis on ranks.



**Fig. 7.** Influence of the averaging on hydrophobic solvent visualization. Top: set of particles all centered on the trans-membrane helices, with the same orientation. The inner dash circle represents the volume around the membrane protein where the hydrophobic solvent is always present. The outer dotted circle represents the spread upto where the solvent belt can be visualized. The solvent is shown in grey, with various shapes to highlight its variability around the trans-membrane domain. Bottom: The result of the averaging is a clear definition of transmembrane helices, and a gradient of presence for the solvent radiating away from the protein boundary. The level 1 and 2 correspond to the levels presented on the map-density distribution.

Parametric statistics compare distributions of means, and give confidence interval of the mean. These metrics are useful to interpret the data, but they are also skewed by the number of data points used. The larger the number, the better the definition of the distribution. Usually, 30 to 50 individual data points is considered a minimum for parametric statistics [40]. Non-parametric statistics differentiate distributions based on ranks and are less sensitive to the amount of data points and to outliers. Both statistical methods were used on the data sets evaluated. In case of a difference in significance, non-parametric statistics were preferred and reported.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2021.183693>.

#### Author contributions

XR extracted the database. VZ measured all distances. VZ, AG and VC created the figures and analysed the data. All authors wrote the manuscript.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, Lyon University and the French National Research Agency, ANR-CLAMP2-18-CE11-0002-01 to PF and VC and ANR-19-CE11-0023-01 to VC and PF.

#### References

- [1] B.C. Choy, A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863 (3) (2021) 183533.
- [2] C. Le Bon, et al., Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy, *Q. Rev. Biophys.* (2021) 1–62.
- [3] A.M. Seddon, P. Curnow, P.J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim. Biophys. Acta* 1666 (1–2) (2004) 105–117.
- [4] V. Chaptal, et al., Quantification of detergents complexed with membrane proteins, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41751.
- [5] P.S. Chae, et al., Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins, *Nat. Methods* 7 (12) (2010) 1003–1008.
- [6] S.C. Lee, et al., Steroid-based facial amphiphiles for stabilization and crystallization of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (13) (2013) E1203–E1211.
- [7] S. Lund, et al., Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 264 (9) (1989) 4907–4915.
- [8] K.A. Nguyen, et al., Glycosyl-substituted dicarboxylates as detergents for the extraction, over-stabilization, and crystallization of membrane proteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57 (11) (2018) 2948–2952.
- [9] X. Jiang, et al., Evidence for an intermediate conformational state of LacY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (12) (2012) E698–E704, <https://doi.org/10.1073/pnas.1201107109>, Epub 2012 Feb 21.
- [10] T.H. Bayburt, S.G. Sligar, Membrane protein assembly into nanodiscs, *FEBS Lett.* 584 (9) (2010) 1721–1727.
- [11] A.O. Oluwole, et al., Solubilization of membrane proteins into functional lipid-bilayer nanodiscs using a diisobutylene/maleic acid copolymer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56 (7) (2017) 1919–1924.
- [12] J.M. Dörr, et al., The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research, *Eur. Biophys. J.* 45 (1) (2016) 3–21.
- [13] A. Marconnet, et al., Solubilization and stabilization of membrane proteins by cycloalkane-modified amphiphilic polymers, *Biomacromolecules* 21 (8) (2020) 3459–3467, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00929>, Epub 2020 Jul 23.
- [14] E.S. Salnikov, et al., Solid-state NMR structural investigations of peptide-based nanodiscs and of transmembrane helices in bicellar arrangements, *Chem. Phys. Lipids* 219 (2019) 58–71.
- [15] M. Overduin, M. Esmaili, Memtein: the fundamental unit of membrane-protein structure and function, *Chem. Phys. Lipids* 218 (2019) 73–84.
- [16] B. Krishnarjuna, T. Ravula, A. Ramamoorthy, Detergent-free extraction, reconstitution and characterization of membrane-anchored cytochrome-b5 in native lipids, *Chem. Commun.* 56 (48) (2020) 6511–6514.
- [17] E. Prade, et al., A minimal functional complex of cytochrome P450 and FBD of cytochrome P450 reductase in nanodiscs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57 (28) (2018) 8458–8462.
- [18] E.J. Dufourc, Bicycles and nanodiscs for biophysical chemistry, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1863 (1) (2021), 183478.
- [19] T. Ravula, N.Z. Hardin, A. Ramamoorthy, Polymer nanodiscs: advantages and limitations, *Chem. Phys. Lipids* 219 (2019) 45–49.
- [20] N.T. Johansen, et al., Structural and biophysical properties of supercharged and circularized nanodiscs, *Langmuir* 37 (22) (2021) 6681–6690, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00560>, Epub 2021 May 26.
- [21] T. Bengtson, et al., Structure and dynamics of a nanodisc by integrating NMR, SAXS and SANS experiments with molecular dynamics simulations, *elife* 9 (2020).
- [22] P. Stepien, et al., Complexity of seemingly simple lipid nanodiscs, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1862 (11) (2020), 183420.
- [23] S.H.W. Scheres, Chapter six - processing of structurally heterogeneous cryo-EM data in RELION, in: R.A. Crowther (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2016, pp. 125–157.
- [24] M.K. van Goor, et al., High-resolution structures of transient receptor potential vanilloid channels: unveiling a functionally diverse group of ion channels, *Protein Sci.* 29 (7) (2020) 1569–1580.
- [25] C. Thomas, R. Tampé, Structural and mechanistic principles of ABC transporters, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 605–636.
- [26] R. Fredriksson, et al., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families: phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Mol. Pharmacol.* 63 (6) (2003) 1256–1272.
- [27] J.D. Perlmutter, J.-L. Popot, J.N. Sachs, Molecular dynamics simulations of a membrane protein/amphipol complex, *J. Membr. Biol.* 247 (9) (2014) 883–895.
- [28] M. Eitzkorn, et al., How amphiphiles embed membrane proteins: global solvent accessibility and interaction with a flexible protein terminus, *J. Membr. Biol.* 247 (9) (2014) 965–970.
- [29] A.J. Wolfe, et al., Quantification of membrane protein-detergent complex interactions, *J. Phys. Chem. B* 121 (44) (2017) 10228–10241.
- [30] E. Pebay-Peyroula, et al., Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin, *Structure* 3 (10) (1995) 1051–1059.
- [31] S. Penel, et al., Detergent binding in trigonal crystals of OmpF porin from *Escherichia coli*, *Biochimie* 80 (5–6) (1998) 543–551.
- [32] A. Punjani, D.J. Fleet, 3D Variability Analysis: Directly Resolving Continuous Flexibility and Discrete Heterogeneity From Single Particle Cryo-EM Images, *bioRxiv*, 2020, p. 2020.04.08.032466.
- [33] S.R. Harvey, et al., Probing the structure of nanodiscs using surface-induced dissociation mass spectrometry, *Chem. Commun. (Camb.)* 56 (100) (2020) 15651–15654.
- [34] R.I. Reis, I. Moraes, Probing membrane protein assembly into nanodiscs by in situ dynamic light scattering: A(2A) receptor as a case study, *Biology (Basel)* 9 (11) (2020).
- [35] I.G. Denisov, S.G. Sligar, Nanodiscs in membrane biochemistry and biophysics, *Chem. Rev.* 117 (6) (2017) 4669–4713.
- [36] S. Inagaki, R. Ghirlando, R. Grishammer, Biophysical characterization of membrane proteins in nanodiscs, *Methods* 59 (3) (2013) 287–300.
- [37] I. Chen, et al., Glutamate transporters have a chloride channel with two hydrophobic gates, *Nature* 591 (7849) (2021) 327–331, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03240-9>, Epub 2021 Feb 17.
- [38] D.M. Kern, Cryo-EM Structure of the SARS-CoV-2 3a Ion Channel in Lipid Nanodiscs, *bioRxiv*, 2021, p. 2020.06.17.156554.
- [39] T.D. Goddard, et al., UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis, *Protein Sci.* 27 (1) (2018) 14–25.
- [40] Student, The probable error of a mean, *Biometrika* 6 (1908) 1–25.
- [41] M. Liao, et al., Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy, *Nature* 504 (7478) (2013) 107–112.
- [42] E. Cao, et al., TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms, *Nature* 504 (7478) (2013) 113–118.
- [43] Y. Gao, et al., TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action, *Nature* 534 (7607) (2016) 347–351.
- [44] R.A. Pumroy, et al., Molecular mechanism of TRPV2 channel modulation by cannabidiol, *elife* 8 (2019).

J'ai également participé à la rédaction d'un autre article relatif à la cryo-EM dans lequel nous détaillons les spécificités des protéines membranaires de l'aspect expérimental jusqu'au traitement de données.

- g. Publication 4 : Cryo-EM data analysis of membrane proteins. Practical considerations on amphipathic belts, ligands and variability analysis

**Title: CryoEM data analysis of membrane proteins. Practical considerations on amphipathic belts, ligands and variability analysis.**

Authors: Alexia Gobet<sup>1,2</sup>, Loïck Moissonnier<sup>1,2</sup>, Vincent Chaptal<sup>1\*</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup> Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR5086 CNRS University Lyon1, 7 passage du vercors, 69007, Lyon, France

<sup>2</sup> Authors contributed equally to the work

\* To whom correspondence should be addressed

Vincent Chaptal: [vincent.chaptal@ibcp.fr](mailto:vincent.chaptal@ibcp.fr)

## **Abstract**

Membrane proteins data analysis by cryoEM shows some specificities, as can be found in other typical investigations such as biochemistry, biophysics or X-ray crystallography. Membrane proteins are typically surrounded by an amphipathic belt that will have some degree of influence on the 3D reconstruction and analysis. In this chapter, we review our experience with the ABC transporter BmrA, as well as our statistical analysis of amphipathic belts around membrane proteins, to bring awareness on some particular features of membrane protein investigations by cryoEM.

## **Introduction**

Electron microscopy under cryogenic conditions (cryoEM) has been a major game changer for structural investigation of membrane proteins, especially to obtain high resolution structures using single particle analysis. This was granted by technological advances on the microscopes and the detectors, and yielded a true resolution revolution [1] that permitted investigators to reach routinely the same resolutions as the one given by X-ray crystallography. Besides, in addition to reach high resolution, cryoEM is able to capture protein undergoing turnover transitions, and is thus able to decipher many transition states in the conformational spectra of proteins. All these elements make that cryoEM has become a major route for membrane proteins structural investigations.

Like for X-ray crystallography, cryoEM analysis of membrane proteins comes with specificities distinct from soluble proteins studies, and investigators willing to embark in membrane protein structural investigations should be aware of them. This chapter aims at addressing these specificities, using the ABC transporter BmrA as an archetypical example of membrane proteins of moderate size. All specificities found on this protein will also apply on other proteins of similar size.

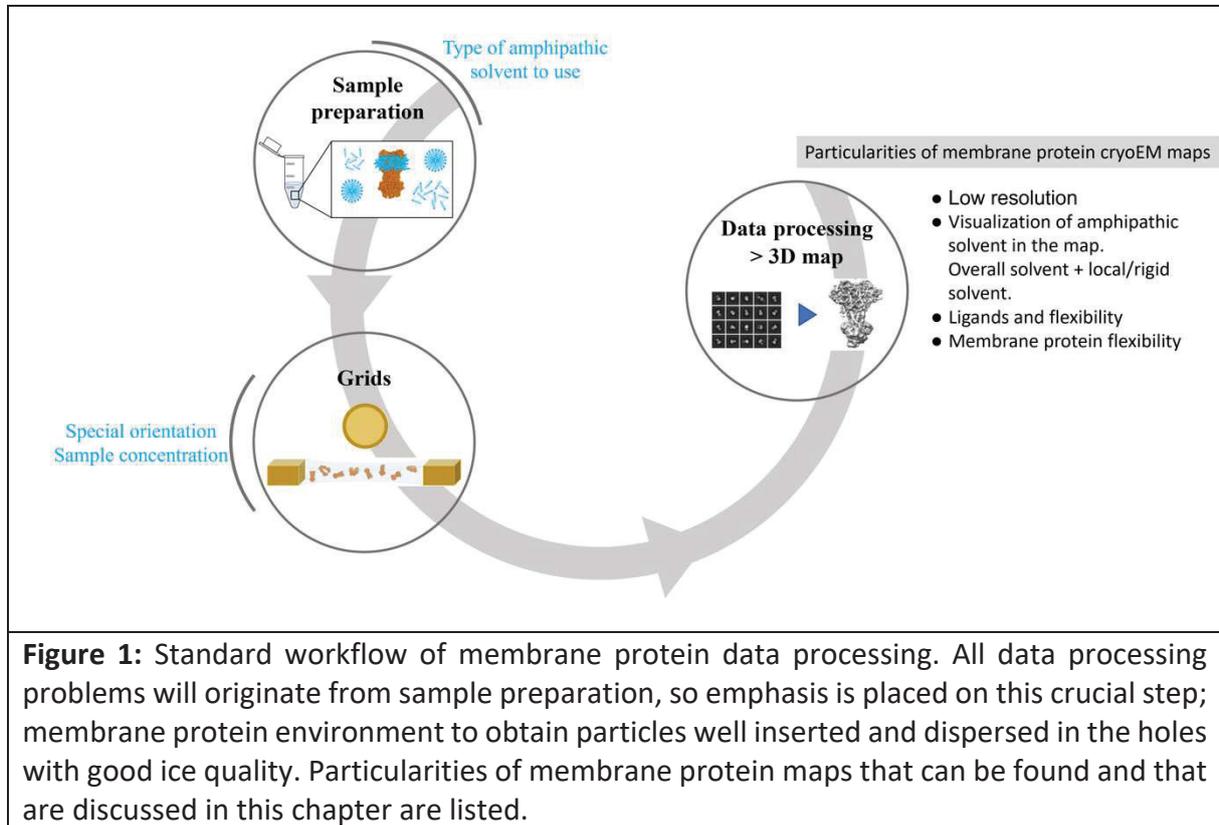
This chapter has been built on four main parts, describing 1/ practical implication on data-processing and experimental handling of membrane proteins, 2/ specificities of the processed maps, 3/ ligands in cryoEM maps, and 4/ visualizing movements captured by cryoEM.

### **1. Typical workflow of membrane protein structure determination.**

#### **1.1. Typical workflow.**

A typical data-processing workflow for membrane proteins starts at sample preparation. It is of outmost importance to have a “good” sample that will distribute nicely within holes, that shows no aggregation or special orientation (discussed below), etc... If the membrane protein sample behaves well, advances in software have been so large in the past years that no special difficulty is envisioned. It is our experience that difficulties arising in data processing almost always stem from a sample not being ideally distributed within the holes.

Thus, we would like to stress that for well-behaved samples, almost automatic data processing using a blob-picker to detect particles, and classical 2D classification followed by initial model generation and refinement can yield a near high-resolution structure. If the procedure fails, it is often worth going back to the sample preparation stage as many difficulties in data processing will be solved by having particles well distributed in the ice.



## 1.2. Membrane protein and special orientations; grid-type

A problem sometimes encountered in cryoEM data processing in general is preferred orientation, caused by particles mostly oriented by a clustering at the air-water interface, and thus lacking all the views needed for high-resolution reconstruction [2, 3]. It results in lower resolution, and the appearance of artifacts in the map. This phenomenon is also encountered for membrane proteins, albeit it must be said that the use of amphipathic molecules is this time an advantage to prevent this phenomenon, and these molecules can be used to modulate it. Indeed, detergents or other polymers are surfactants, naturally distributing at the air-water interface. They thus saturate this surface and tend to protect membrane proteins from distributing at this interface. Alternatively, they can be supplemented to the purified membrane protein to first saturate this interface before the protein does, allowing particles to distribute within holes. The use of fluorinated detergents has been reported for this purpose as well as CHAPS, CHAPSO, digitonin or Octyl-glucoside [3-5]. It must be noted that other detergents also have this capability as well as polymers such as amphipols[6], where addition of tensio-active molecules tend to reinforce the liquid film formed in the holes. All detergents used for this purpose tend to have high critical micellar concentration, synonym

of a fast exchange between monomers and micelles and a significant number of free monomers to be able to saturate the air-water interface.

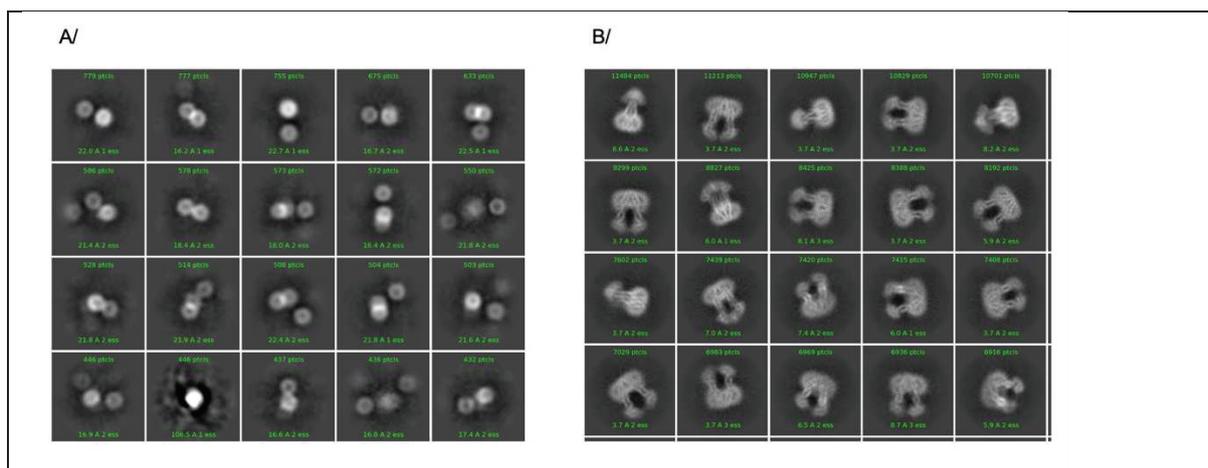
Another important parameter to take into account to prepare cryoEM grids of membrane proteins, is the type of grid to be used. Indeed, most grids have a holey carbon layer on top in which holes are present and where the liquid distributes. Carbon being naturally hydrophobic, it tends to adsorb non-specifically a large amount of sample before it has time to distribute within holes. Thus, for membrane proteins that are naturally hydrophobic, it is necessary to increase sample concentration to saturate the carbon and then to introduce proteins in holes. Typically, for the ABC transporter BmrA in detergents, concentration of 3-4 mg/ml are needed for a good sample distribution [7]. This has also been seen for GPCRs where it is not unusual to see protein concentration as high as 6 to 10 mg/ml [8]. Replacing detergents by peptidiscs somewhat reduces this effect, and much lower protein concentration (0.6 mg/ml) are needed to apply the ABC transporter Pdr5 on a grid [9]. Investigators are thus directed to critically assess the concentration at which they apply the sample on the grid according to the amphipathic environment they use. Alternatively, new types of grids are available, using a gold thin sheet to replace the carbon layer, which reduces a bit the non-specific adsorption of membrane protein. It is also noted that the use of graphene-oxide layers is a good alternative to preferred-orientation, allowing more random particle distribution and orientation and yielding high-resolution reconstruction [10].

### **1.3. How to distinguish real membrane protein particles from micelles.**

One difficulty encountered more and more frequently is to solve high resolution structures of detergent micelles. Indeed, detectors have improved so much that it is fairly easy to see detergent micelles on micrographs and it is difficult to differentiate a micelle from a subdomain or a side view in particle picking. Therefore, blob-picking often selects detergent micelles on micrographs, resulting in large particle datasets after extraction with mostly micelles. It is possible for users to be more stringent during particle picking in order to reduce too much low-level picking on micrographs. However, and this is especially true for small membrane proteins or proteins with defined domains, this will be at the expense of selecting particles that could be useful for high resolution reconstruction. We therefore tend to pick as many particles as possible and sort them through 2D and 3D classification.

Detergent micelles can be distinguished in 2D classification by an absence of secondary structure on which the particle alignment can anchor itself (Figure 2). Detergent micelles can also be observed in *ab-initio* model generation via a model with no shape, smaller size compared to the protein, and that won't refine to high-resolution with defined secondary structures.

If too much detergent is included in the final sample concentration before applying it on the grid (see methods on how to control detergent amount here: [11]), many detergent micelles can be seen and can sometimes replace membrane proteins in the holes resulting in absence of good particles during picking, and an entire dataset wasted. Figure 2 shows an example of 2D classes of the DDM/Cholate detergent mixture micelles (left) and BmrA 2D classes (right).



**Figure 2:** 2D classification of detergent micelles or membrane protein. **A/** 2D classes of detergent micelles from the DDM/Cholate mixture in the 1:1 ratio. Absence of secondary structure is noticeable along with a small size of the particles (around 50 Å diameter). **B/** 2D classes of the ABC transporter BmrA. Typical protein shape can be observed, as well as transmembrane helices and the detergent belt. Data processing has been conducted in cryosparc v3.3 with a box size of 200 Å.

#### 1.4. Types of amphipathic solvents available for membrane protein structural investigations.

As invoked above, many types of amphipathic solvents are available to handle membrane proteins [12]. Detergents are still a very useful tool to extract and handle membrane proteins, and result in many instances in behavior similar to native membranes, as seen on the highly debated wide inward-open structure of the ABC transporter MsbA [13]. Membrane proteins in detergents are easy to handle for cryoEM grids. Detergents can then be replaced by multiple environments. A very popular environment is the polymer amphipol [12], very useful to stabilize membrane proteins and that has been successfully used to solve membrane protein structures. Membrane proteins can also be placed in peptidiscs [14] or saposins [15], which are both amphipathic peptides that wraps around the hydrophobic region of the membrane protein with success to solve their structure. They can also be placed in lipidic nanodiscs[16], which come in multiple flavors. As mentioned above, the membrane protein concentration used for these different environments is to be adapted, with higher concentration required for proteins in detergents, and a smaller one for membrane proteins in other types of environments. Finally, it has been recently reported the structure of membrane proteins in liposomes [17], to mimic even more the natural environment. It should be noted that this later method requires extensive optimization to include liposomes within holes, in good and homogeneous amount for data collection.

#### 1.5. The case of small membrane proteins.

The limit at which proteins can be solved by cryoEM keeps on being pushed back to smaller and smaller proteins, so no prognostic will be made here on what would be the limit. But certainly, smaller proteins have less contrast and are thus harder to spot on micrographs, for example for screening purposes. Also, smaller proteins tend to be more spherical, which makes the alignment procedures more difficult to perform and to reach higher resolution. Membrane protein can benefit from their insertion into lipidic nanodiscs, which will both increase the size and guide the alignment by bringing the membrane plane in which the

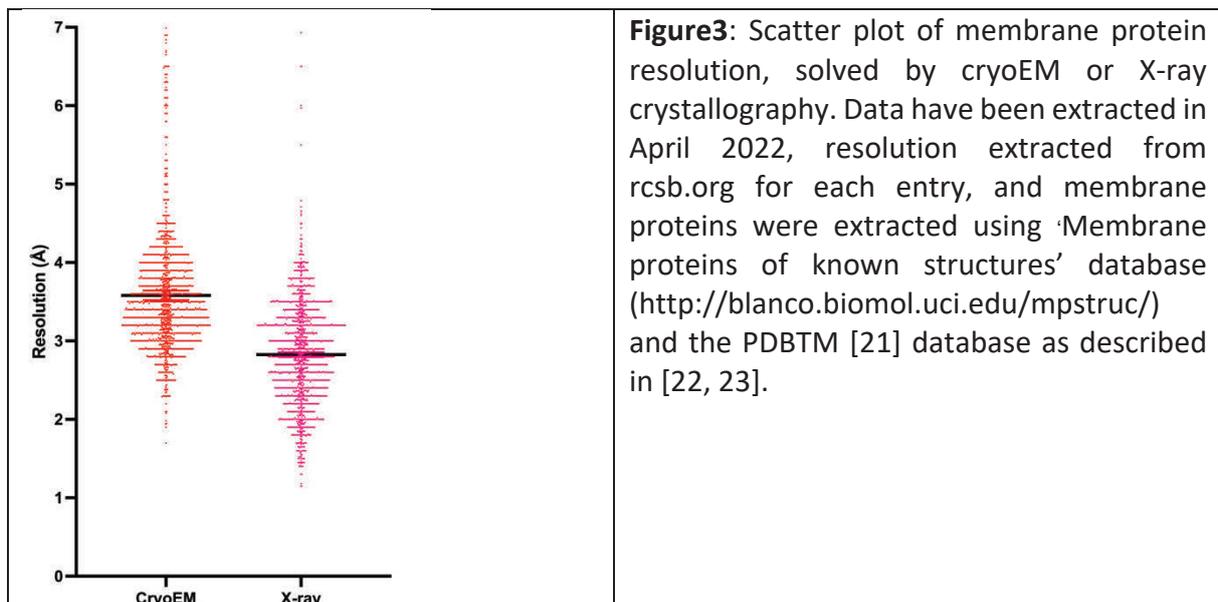
membrane protein is inserted. Additionally, the use of antibody or nanobody is a good alternative, both increasing the size of the protein, and bringing asymmetry that will be useful for orientation and 3D reconstruction.

### 1.6. Membrane protein and low resolution – model building.

As shown on Figure 3, structures of membrane proteins solved by cryoEM still stay at moderate resolution. Two main issues stem from this limitation:

i). Building an accurate model and placing side chains correctly is a major challenge at low resolution. This is always the case at moderate resolution, as some parts of the structure are mobile and local resolution will be probably worse than at the protein core. This problem is central to model building and not specific to cryoEM, so care is emphasized in tracing the chain. Thankfully, the new improvement in *de-novo* structure modelling using deep learning [18, 19] serves as an excellent guide to protein modelling. Also, the model generated can be used to create a new template using alphafold2 in refinement-like procedures [20], that helps with correcting mistakes during model building.

ii). 3D reconstruction can result in maps with inverted hands, as a particle extracted has no information of being seen from the top or from the bottom. If the map is of sufficient resolution, then a careful inspection can allow for the distinction of the correctness of the hand, but this is definitely harder at lower resolution. Here again, the use of models originating from deep-learning methods is encouraged as it will be impossible to fit them in maps with inverted hands, thus leading to the correct choice for the hand.



## 2. Visualization of amphipathic belts.

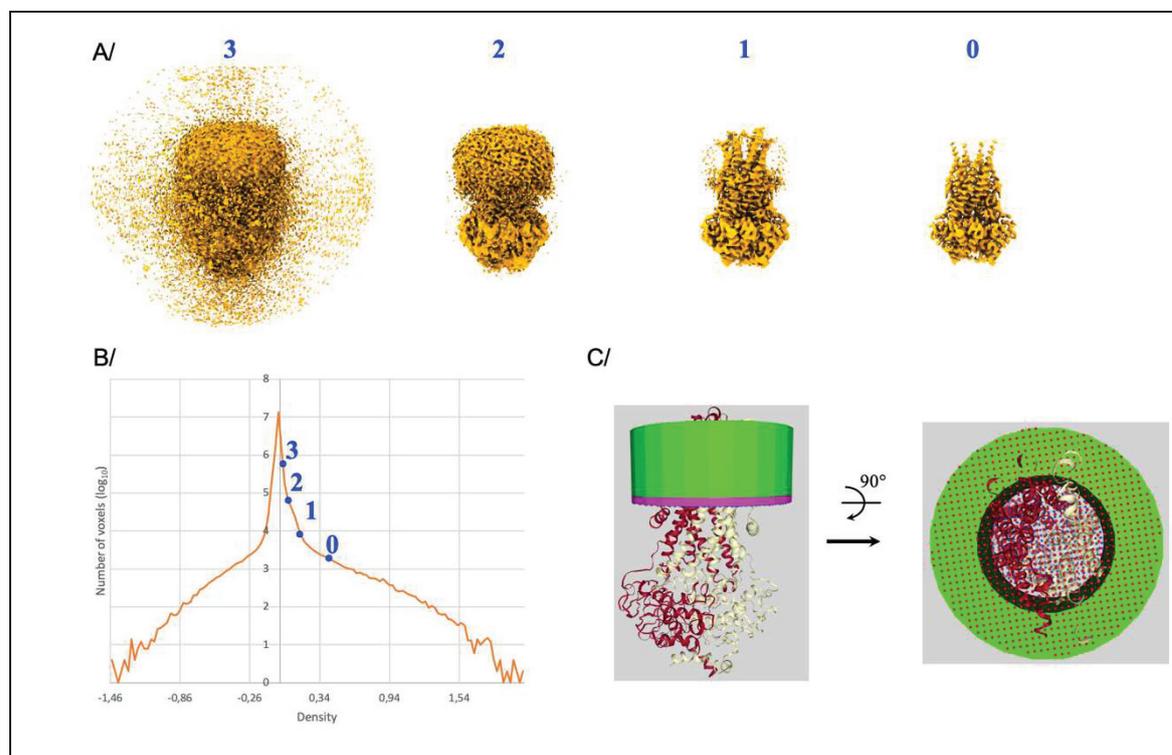
### 2.1. Visualization of amphipathic belts in cryoEM maps

Membrane proteins are always in a couple with their amphipathic belt, and cryoEM allows for the first time to visualize it. Before, the only way to study structurally this belt was through molecular dynamics simulations, as the belt was not observable by X-ray crystallography. We have studied this belt using statistical analysis to identify features or trends that could potentially be useful for investigators. An important point raised is that, contrary to X-ray

crystallography, cryoEM maps are not normalized, and it is thus difficult to talk about map levels to refer to particular features in the map. By looking at hundreds of maps, we were able to identify a feature in map density histograms that reveals the position of the amphipathic belt, and somewhat normalizes its use. We identified 4 levels [24](Figure 4); i). level 0 corresponds to the visualization of high-resolution features, ii). level 1 corresponds to the location where the map density curve inflexes, and corresponds to the appearance of the high contour signal for the amphipathic belt. iii). This belt increases in size until level 2, where the curve stops to increase logarithmically and signals the maximum observed size for the belt. iv). Level 3 signifies the appearance of large amount of low-level map features everywhere throughout the box, corresponding to noise.

One word of caution is raised as the rise in map density histograms between levels 1 and 2 can also be observed for proteins displaying flexible domains, and for which the appearance of low-resolution features will also give rise to such behavior on the map density curve. Thus, user input is advised to ensure the correspondence between cryoEM maps and location of hydrophobic belts.

We compared membrane protein structures that have been solved in multiple environments to explore whether this amphipathic environment would have an influence on 3D reconstructions. Using statistical methods, we could show that for a single protein, the size of the amphipathic belt is similar between nanodisc, amphipols and detergents, contrary to general belief. By comparing with detergent quantification, we could also reveal that the size of the belt observed in cryoEM is smaller than the volume occupied by the total amount of solvent covering the hydrophobic patch of membrane proteins. Comparison can be made using the detbelt server [25] ([www.detbelt.ibcp.fr](http://www.detbelt.ibcp.fr)) to estimate the volume occupied by detergents or amphipols around any membrane protein. The points raised provide critical thinking to investigators when they observe cryoEM maps.



**Figure 4:** Visualization of amphipathic belts in cryoEM reconstructions. A/ 3D volume of the ABC transporter BmrA (EMD-12170) seen at different contour levels, which are displayed on top (blue number). These contour levels correspond to features in the map density histogram displayed in B/. C/ Correspondence with the quantified amount of detergent for this transporter, displayed using the *detbelt* server.

## 2.2. Influence of averaging and symmetry on the visualization of amphipathic belts in cryoEM

CryoEM relies on averaging to increase the signal resulting from protein features while decreasing the noise. There is also the notion behind it that proteins are in the same orientation, thus allowing to increase the signal. However, amphipathic belts are known to be very fluid, and are thus by definition never in the same place. The consequence is that averaging only keeps the common minimum layer in all the particles used for 3D reconstruction and it is the reason why amphipathic belts are nice and round in 3D reconstruction. Another feature revealing this underlying principle is the fact that the belt increases in size from level 1 to level 2 on the map, denoting different level of common minimum during the reconstruction, or an increase in flexibility.

Besides, symmetry is often used to improve resolution in 3D reconstructions, and this can have impacts on the shape of amphipathic belts that can be sometimes seen as following closely the protein shape, and in some extreme cases to create some clear artifacts on the shape of the amphipathic belts (Note that these artifacts are observed on the amphipathic belt but symmetry is key to improve resolution on the protein, and does not trigger the same artifacts on the protein map).

## 2.3. Lipids or detergents in cryoEM maps

In addition to observing nearly the whole of amphipathic belts, cryoEM maps are also rich in map features in the outside of proteins, facing the hydrophobic environment, that could be interpreted as lipids or other amphipathic molecules. A nice review of this topic has been created by V. Biou [26] and the reader is referred to this article for further details.

This fact also raises the question of how to interpret map features in the amphipathic belt region, how to distinguish a real lipid/detergent, etc... from noise. Often, only small portions of the lipid are observed, making it difficult to model it with certainty. Investigators are encouraged to back up their modeling claims with biochemistry and mutant data to ascertain positioning of such ligands, flexible in nature. Improvement in resolution will on one hand help to distinguish between all these options, and new technological improvements (microscopes, detectors, software) continuously improve resolution, leading to a bright future in modelling of hydrophobic elements around membrane proteins. On the other hand, it should be kept in mind that these ligands are naturally flexible, and often display different orientation from protein to protein (or particle to particle). Therefore, averaging will cancel out their individual position and it might never be possible to model them in one place, while they should be inspected with molecular dynamics simulations instead.

## 3. Visualization of ligands.

### 3.1. Ligand visualization and resolution.

Visualizing ligands in cryoEM maps is of major interest, but it could be difficult to ascertain their presence. Many factors play a role in this difficulty, the first one being resolution. Like

for X-ray crystallography, lower resolution makes it harder to visualize the ligand, with sometimes only partial densities present for some ligand moieties. But unlike crystallography where the phases could be refined leading an improvement in the maps, the cryoEM maps are final and investigators need to judge the presence of their ligands on those. And the use of heavy atom for their anomalous signal cannot be used in cryoEM. Another difficulty results from partial occupancy and the use of symmetry in the calculation of the maps (discussed below), that can result in a loss of signal for the ligand, and a low contour level. Depending on the location of the ligand, it could be at similar contour level as the amphipathic belt, adding to the difficulty in judging if a particular density originates from the ligand of interest or from amphipathic molecules or even noise in the reconstruction. For the ABC transporter BmrA we were faced with this difficulty. We were able to ascertain the presence of Rhodamine 6G by multiple methods. 1/ First the presence of the density corresponded to the ligand binding pocket. 2/ We were able to improve the ligand density by using a mask removing the detergent belt and using non-uniform refinement without symmetry [7]. It should be noted that this procedure worked with cryosparc v2, but further improvements of the algorithms makes that the influence of the belt in reconstruction appears to be less and less as software evolve. We encourage to try several refinement procedures and judge the output. 3/ The resolution of BmrA in the same condition but without ligand shows a disappearance of the density. 4/ Biochemistry showed that Rhodamine 6G binds more strongly than possible competitors for this binding site. 5/ molecular dynamics simulation with Rhodamine 6G in the site defined by cryoEM confirmed a plausible binding site. The use of mutants to probe a binding-site is also a tool to be used for this purpose. This example shows that the use of many methods to ascertain the presence of a ligand is a good idea to back up a claim on ligand position.

### **3.2. Effect of symmetry on ligand visualization; case of flexible ligands or plastic binding-sites.**

CryoEM is an averaging method to reach high resolution, as discussed above on the contribution to visualize amphipathic solvents. Therefore, if a ligand is partially present in the binding-site of an oligomeric protein, the quality of the map for the ligand will be decreased if a symmetry is enforced. Similarly, if a ligand is fully present in all binding site but is mobile, averaging will keep the common parts of all sites and cancel out the diverging parts. It should be noted that these effects are not restricted to ligands and have also been observed on protein subdomains for example [27-30]. There isn't a magic way to deal with this problem, that was also present in X-ray crystallography. In cryoEM, the generation of both symmetrized and non-symmetrized maps, and their comparison can give clues on the effect of symmetry on the presence of a particular feature. If the ligand is part of a clearly identifiable subdomains, it could be worthwhile to perform local refinement of this domain, perhaps in combination with particle subtraction to attempt to increase the signal. Another avenue is the use of symmetry expansion followed by local refinement in the absence of symmetry, that could give rise to maps that will differ around the ligand-binding site. Here again, investigators are encouraged to perform a multiple investigation of the ligand binding site as described in 3.1 to ascertain the position of their ligand.

## **4. Variability analysis of cryoEM structures.**

#### 4.1. Membrane proteins are flexible objects

Membrane proteins are flexible objects, with different parts of the structure undergoing a whole range of deformations. It could be rotations and deformations of the trans-membrane part, or movements of domains on either side of the membrane. These movements can be small or large depending on the type of protein or complex observed, and vary if a ligand is bound to the protein. The ability to observe these movement is definitely a hallmark of cryoEM, able to capture protein flexibility during the freezing process, and is able to render this variability by cutting edge computation of particle variability compared to a consensus map. It results in a series of maps showing the protein movement.

#### 4.2. Interpretation of membrane protein movements

While seeing a protein move is an amazing sight, very quickly we want to dig deeper and decipher the parts of the protein moving, understand how they are moving, what parts is the driver of the movement, which part is reacting to a signal, what type of rotation/translation is occurring, etc... It is very hard to draw such conclusion by looking at a map, and even for a specialist of a protein it is impossible to pinpoint to specific residues. This is even more true if the protein is large, or the movement calculated at low resolution. We thus created a software that refines a structure in each of the maps originating from variability. It results in an ensemble of structures that describe the protein movement. This structure bundle can be used to dissect out the flexible or mobile parts of the structure, measure deformation angles and distances, identify pivot points, etc. It allows to decipher protein flexibility deeper, and is a tool to explore experimental flexibility [31].

### 5. Conclusion

Like other aspects of their studies, membrane proteins have specificities. For example, investigators need to have knowledge on detergents or lipids to analyze their purification experiments or binding assays. While the amphipathic environment has influence on membrane protein behavior in solution, it also influences cryoEM reconstructions, and create specific features that can be observed and analyzed. We have presented here some of the specificities linked to membrane protein studies by cryoEM, to bring awareness on these specificities and provide a framework for critical thinking.

**Acknowledgments.** This work was supported by the CNRS, the French National Research Agency grant number ANR-19-CE11-0023-01 to VC and AG, and the Doctoral School fellowship to LM. The authors wish to thank Xavier Robert for his help with extracting the data to create Figure 3, the distribution of resolution between methods.

1. Kühlbrandt, W., *The resolution revolution*. Science, 2014. **343**(6178): p. 1443-1444.
2. Noble, A.J., et al., *Routine single particle CryoEM sample and grid characterization by tomography*. Elife, 2018. **7**.
3. Armstrong, M., et al., *Microscale Fluid Behavior during Cryo-EM Sample Blotting*. Biophys J, 2020. **118**(3): p. 708-719.
4. Chen, J., et al., *Eliminating effects of particle adsorption to the air/water interface in single-particle cryo-electron microscopy: Bacterial RNA polymerase and CHAPSO*. J Struct Biol X, 2019. **1**.

5. Baker, M.R., G. Fan, and Serysheva, I., *Single-Particle Cryo-EM of the Ryanodine Receptor Channel in an Aqueous Environment*. Eur J Transl Myol, 2015. **25**(1): p. 4803.
6. Michon, B., et al., *Role of surfactants in electron cryo-microscopy film preparation*. Biophysical journal, 2022. **Submitted**.
7. Chaptal, V., et al., *Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter*. Sci Adv, 2022. **8**(4): p. eabg9215.
8. Danev, R., et al., *Routine sub-2.5 Å cryo-EM structure determination of GPCRs*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 1-10.
9. Harris, A., et al., *Structure and efflux mechanism of the yeast pleiotropic drug resistance transporter Pdr5*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 5254.
10. Glaeser, R.M., *Proteins, interfaces, and cryo-EM grids*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2018. **34**: p. 1-8.
11. Gobet, A., et al., *The non-Newtonian behavior of detergents during concentration is increased by macromolecules, in trans, and results in their over-concentration*. Biochimie, 2022.
12. Le Bon, C., et al., *Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy*. Q Rev Biophys, 2021: p. 1-62.
13. Galazzo, L., et al., *The ABC transporter MsbA adopts the wide inward-open conformation in E. coli cells*. Sci Adv, 2022. **8**(41): p. eabn6845.
14. Carlson, M.L., et al., *The Peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution*. Elife, 2018. **7**: p. e34085.
15. Flayhan, A., et al., *Saposin lipid nanoparticles: A highly versatile and modular tool for membrane protein research*. Structure, 2018. **26**(2): p. 345-355. e5.
16. Denisov, I.G. and S.G. Sligar, *Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics*. Chemical Reviews, 2017. **117**(6): p. 4669-4713.
17. Yang, X., et al., *Structure deformation and curvature sensing of PIEZO1 in lipid membranes*. Nature, 2022. **604**(7905): p. 377-383.
18. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
19. Baek, M. and D. Baker, *Deep learning and protein structure modeling*. Nature Methods, 2022. **19**(1): p. 13-14.
20. Terwilliger, T.C., et al., *Improved AlphaFold modeling with implicit experimental information*. Nature Methods, 2022. **19**(11): p. 1376-1382.
21. Kozma, D., I. Simon, and G.E. Tusnády, *PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D524-9.
22. Martin, J., et al., *Specific X-ray diffraction patterns of membrane proteins caused by secondary structure collinearity*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2022. **1865**(1): p. 184065.
23. Robert, X., et al., *X-ray diffraction reveals the intrinsic difference in the physical properties of membrane and soluble proteins*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17013.
24. Zampieri, V., et al., *CryoEM reconstructions of membrane proteins solved in several amphipathic solvents, nanodisc, amphipol and detergents, yield amphipathic belts of similar sizes corresponding to a common ordered solvent layer*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2021: p. 183693.
25. Zampieri, V., et al., *The Det.Belt Server: A Tool to Visualize and Estimate Amphipathic Solvent Belts around Membrane Proteins*. Membranes, 2021. **11**(7): p. 459.

26. Biou, V., *Lipid-membrane protein interaction visualised by cryo-EM: A review*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2023. **1865**(1): p. 184068.
27. Jones, R., et al., *Structural basis and dynamics of Chikungunya alphavirus RNA capping by the nsP1 capping pores*. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.08.13.503841.
28. Bai, X.-c., et al., *Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human  $\gamma$ -secretase*. *eLife*, 2015. **4**: p. e11182.
29. Ilca, S.L., et al., *Localized reconstruction of subunits from electron cryomicroscopy images of macromolecular complexes*. *Nature communications*, 2015. **6**(1): p. 1-8.
30. Roh, S.-H., et al., *Subunit conformational variation within individual GroEL oligomers resolved by Cryo-EM*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(31): p. 8259-8264.
31. Afonine, P.V., et al., *Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement*. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.12.23.521827.

#### IV. Analyse 3D du mouvement d'une protéine et « variability refinement »

L'avantage indéniable de la cryo-EM réside dans la capacité à observer les protéines en mouvement. En effet, lors de l'étape de congélation, les protéines ne sont pas synchrones et peuvent s'échantillonner sur un paysage conformationnel spécifique à l'expérience. Il est par exemple possible de figer une conformation avec un ligand/inhibiteur ou au contraire de faire « tourner » la protéine et la piéger en plein fonctionnement (« turnover conditions »). Lors du traitement des données, il est alors possible de séparer les conformations discrètes de la protéine qui vont se classer différemment. Ainsi, sur une même grille, on peut observer simultanément plusieurs conformations et en déduire des informations mécanistiques sur le fonctionnement de la protéine. Une autre innovation consiste à explorer la variabilité continue d'un échantillon. En effet, même pour un échantillon monodisperse, il existe toujours une certaine vibration de la protéine autour d'une conformation majoritaire et donc un continuum de conformations. En 2021, cryoSPARC, le logiciel de traitement des données de cryo-EM que j'ai utilisé durant ma thèse, a développé un outil d'analyse de cette variabilité au sein d'un échantillon. Il analyse la variabilité continue contenue dans l'ensemble des particules permettant la reconstruction à haute résolution et donne un panel des états conformationnels de l'échantillon d'intérêt. Cela permet d'observer la flexibilité de la protéine d'intérêt, essentielle à sa fonctionnalité.

Plus précisément, il analyse la variance des particules par rapport à la reconstruction consensus dans les trois coordonnées de l'espace x, y et z et restitue des différences de densité autour de la reconstruction moyenne, triées par composantes principales. Chaque composante est constituée d'un ensemble de cartes de densité électronique autour de la carte moyenne qui a permis d'obtenir la structure à haute résolution. De plus, chaque composante décrit un type de mouvement (flexion, torsion...) et est classée par ordre d'importance.

Cette analyse donne une série de cartes de densité qui, assemblées, crée un mouvement. La visualisation des mouvements est très intéressante informative mais il est difficile de relier ces changements de cartes à des points particuliers de l'espace et de les mesurer. Les modèles moléculaires sont en effet plus adaptés que des cartes de densité pour comparer les détails moléculaires d'une flexibilité. Nous avons alors saisi cette opportunité pour développer un outil disponible sur le logiciel Phenix. Cet outil, nommé *phenix.varref* (variability refinement), affine et modélise un modèle dans chacune des cartes à partir de la structure de référence. Nous avons utilisé deux protéines d'intérêt pour la démonstration de l'outil : BmrA, la protéine à laquelle je me suis intéressée tout au long de ma thèse et le spliceosome, un complexe protéique beaucoup plus grand.

##### a. Points majeurs de l'article

La procédure pour créer un ensemble de structures qui correspondent à un ensemble de cartes est plus complexe qu'un simple affinement qui ne perturbe pas assez la structure pour atteindre les autres conformations. Nous avons pu constater cela lors de nos premiers tests. Il a ainsi été mis en place une procédure plus agressive qui utilise les fonctions internes de Phenix, le morphing, le recuit simultané (simulated annealing) et l'affinement, en initiant

l'algorithme avec 50 modèles différents et sélectionnant, *in fine*, celui qui a la meilleure corrélation à la carte de destination. Ce processus est incrémental, le modèle n servant à affiner le modèle dans la carte n+1. Nous avons mis au point la procédure sur mes données de variabilité collectées sur BmrA (cf partie 2 du manuscrit), en conformation ouverte vers l'intérieur et l'extérieur (inward et outward-facing).

Afin de tester les possibilités du logiciel, nous avons collaboré avec cryoSPARC qui nous a fourni les données de variabilité du spliceosome (EMPIAR 10080), un complexe ribonucléoprotéique sur lequel nous avons testé le logiciel. Cet essai a fonctionné et montre bien la variabilité et les mouvements de certaines régions de ce complexe.

Certaines limitations à son usage sont décrites dans le manuscrit. Elles sont surtout liées à la résolution utilisée pour créer les cartes. Il n'est par exemple pas possible de visualiser certains ligands à 6 Å de résolution, la procédure *varref* les positionnera en dehors de leur site de fixation. Aussi, certaines régions peuvent avoir des densités de mauvaise qualité pour lesquelles l'affinement ne marchera pas ou ne sera pas guidé par les cartes. Il convient alors d'avoir un regard utilisateur critique pour ne pas surinterpréter ces données. La résolution est ainsi une donnée d'entrée du logiciel lui permettant d'adapter ses stratégies d'affinement.

*Varref* est déjà disponible dans Phenix et fera bientôt l'objet d'un « stable-release ». Des bugs sont régulièrement corrigés par dialogue avec Pavel Afonine (Phenix team, Berkeley, USA).

La performance des outils disponible pour le traitement des données et l'analyse structurale étant de plus en plus élevée, il est maintenant possible de regarder une structure en tant que « corps rigide » mais également de regarder sa flexibilité.

J'ai d'ailleurs utilisé ces outils durant ma thèse mais je les évoquerai plus en détail dans la 2<sup>ème</sup> partie de mon manuscrit.

- b. Publication 5 : Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement



CryαEM

ecrest uiœcufmhuarmpbfesuiœcmmasl evdh mis, ai, srmgf m  
yusugfdl m rz crt rcim



Vuyrfm am recær uGX GM fr pa Nregri 8 GP e a \* M emœccars 8 GM, fœriir m usiœ 8 GM offl m awœc uGM  
Zœarci m Nubiuf 8 GM

<sup>u</sup> Molecular i bogkcyec ay n dÿetraÿen i bob atythmus reyce i erLele( Caÿoyal nuNraSor(hr U cloÿoy 5oanhi erLele(hUO 86), vhf 10

<sup>8</sup> Molecular MikroNblot( ay n IÿucSural i bœPeB hÿ(hf M57vpV UC51 f ybÿegh n(oÿRh) 3aggat e nu FercorhV8vv) n(oÿhKrayce

x C O - P d M D B S M M

x I q O C x O M M

we(s orng  
sl evdh M  
Zusugfdl Mc ufl nmM  
qis, ai, sr m ewrffœ. M  
EPeyb -9arre2

sl evdh Mgnsyuiœc mnyœfe. œufvmt bfr mfcugfr mtoœ ufdkuiœc mrvmt bfr m rirse. rœrdl Gœ m N r M est m r mœsrir m  
riuir m Nui Msr m busugfr Gœ m œciœ, e, m rirse. rœrdl m m m r m f m r m œuf m seir œ m eiœc m r res m u n m r r kœ. A m  
Zusugfdl M c ufl m m m m m œciœ, e, m rirse. rœrdl m r nœsgr m m r m usucœr m r i E r r c m m u s i œ f r m u u a \* m c w m m e f v  
, t r Gœ m w r m f m c m m u b m s œ r m r nœsœ. m N r m y œ, m d i r b m m c w s i u \* r c m l m N r m u t b f r m c m N r m u s i œ f r m u u a \* m  
3 N f r m N n œ m g m s y u i œ c m m g n œ f, i r f l m m, c œ œ. Gœ m m y r s l m u s w l e m œ b œ i m m s, a i, s u f m r i u c f r m e m f r t r c i m d r m N r m  
t u b m m c m s w r s m e m g s o w r m N r m u b m g r i e r r c m g m s y u i œ c m i c w m p b f u c u i œ c G E r m r m c r w m m e e f m N u i m r z c r m m c m  
r c m t g f r m m s, a i, s r m i e m f f m N r m u b m s e t m u s u g f d l m c u f l m m m m œ. m N œ m g, c w r m m s, a i, s r m d m m u n h m e m e i m  
y u s u g f r m u s i œ f r m m s, a i, s r m m m r f f m m N r m u s i œ f r m u u a \* m e i m e y œ. A m e t b u s œ c m e d i n m e f r a, f u s m l c u t œ m m  
m t, f u i œ c m m o n f o m m m m u a i m u i m m r m e y r t r c i m d e f f e m N r m u t r m s r a i œ c m d f g r d m d i n m m œ r s c i m t b f d, w r m  
P o u c w m u c m f r m g r m y r n i o u i r w m œ. m N œ m r i n e w m u s u g f d l m r z c r t r c i m m y u d u g f r m m r m P e y b n œ i u s r m d r G m  
u a a r m g f r m c w s m m r m s e. s u t m u t m P e y b -9 a r r e 2 m m

1. Introduction

Vseirœ m u c m r m r s l m e g d r A O N r l m s r m g f f a i m e m n r s t u f m c i s e b l G m  
u c w l N, m e m r r e s t u i œ c n m e m m r v n r t m c w s. e m s, a i, s u f m N u c. r m m c m  
fœ r m d i n m r œ m a i o y d l m e m f z f f y n r œ m c a i œ c A O N r m m e y r t r c i m d u c. r m  
r s e t m œ a u f m œ b f u a r t r c i m e m s. r m e t u c n m e y r t r c i m d m  
W b m c i d r a r c i f l G m r m m s e i r œ m e i œ c n m r s r m e m l m, i m r m u a n m r m  
N o N s r m f, i œ c m m s, a i, s r m m ( v s u l m a s l n i u f f e. s u b n m e u m i m r m t u c m  
a e c i s g, i e s m m s, a i, s r m d c w m g l m r z c œ c n l œ. m e m œ œ œ m m e y r v  
t r c i m e d i n œ m m s l n i u f m e m r u a n m m o m r n œ f, i œ c A D r y r s i n r f m G m e u m  
n i c f m b e n g f r m e m g m s y r m u s i œ f r m m s, a i, s r m e n r s r m m r m u b m e r s r m  
b e e s l m r z c r w G m b f l œ. m œ a u f m e i œ c A O N r m e t b, i u i œ c m r o s u c n u i œ c m  
P g s u i œ c m j a s r E M O P q m u s u t r i r s m 12 G : m e w r f r w m s. r m s e i r œ m e y r v  
t r c i m e d i n œ m m r m a s l n i u f m e n a n m u c m g r m y œ u f d r w m u m i œ c m i s e b a m  
w œ b f u a r t r c i m u s u t r i r s m f f u t m f f o m c i n g e, i l l s e i r œ m e i œ c n m e, f w g r m  
w w, a r w s m u f a, f u i r w G m, i m m u m i e m l m r e \* r w l e m c m g r m c a r m m m o c u f m  
u c w m f e u l m e m r m e c i r p i m r m m s l n i u f m c f l m œ f, i œ c m h C m u m g f r m e m  
a u b i, s r m s e i r œ m l c u t œ m d r m f i œ. m c m c m e n t g f r m m s, a i, s r m r m m  
z i i œ. m n r m m u c a r m r m u c i n m 4 : A m c r e s i, c u i r f l G m n m r i n e w m m t d r w m  
g l m r m s e i r œ m r k G m m f o w m u i r m h C m m f f i c w s m r y r f e b t r c i m 5 G : M

u c w m u c c e i r u a n m r m s. r m g f f a i m m, w o r w l e w u l A m  
d f r a i s e m c a s e r a e b l m m s l e. r c œ m e c w i œ c n m a s l e v d h m u w r m m r u f m  
g s r u \* i n s e, . m m m m m r. u s w g l m r œ. m g f r m e m œ u f d r m r m u t b f r m c w s m  
i, s c e y r s m e c w i œ c n m m m m m m r n œ f, i œ c m s c y : A m s l e v d h m m m, m g f r m  
i e m b u s u i r m, f i b f r m e c r e s t u i œ c n m m r m u t r m u t b f r m c r m e i r c i a f m  
u b b f o u i œ c m m r m m f, œ u u i œ c m r m r m s, a i, s u f m N u c. r m m, s œ. m m u i v  
u f l i œ a m l a f r m n œ m d f m r w b n i m c m e t b f r p m r a n u c œ m m m w d œ c l e m  
i n r m m s. r m e c r e s t u i œ c u f m N u c. r m d m m m m e m m g f r m e m, s i n r s m m m a i m  
f e a u f m s e i r œ m e i œ c n m 9 - 2 ] : A O N m m m e c r g l m c u f l k œ. m n r m u s u c a r m m  
b u s i œ f r m u u a \* m e m m e f, t r m f e c. m s œ a b u f m e t b e c r c i n d c w l b, i b, i m m  
m s œ m m r l e f, t r m m b œ i œ. m s e i r œ m e i œ c n m  
O n r m m u w d l m y u d u g f r m œ a u f m r e s t u i œ c n m r m m r u f g s r u \* i n s e, . m m m  
e, s m c w s m u c w œ. m m s e i r œ m e y r t r c i m l c u t œ m m u c l m s e i r œ m m m m c m  
r c r s. I m e, s a r m e m c w s. e m s, a i, s u f m e c r e s t u i œ c m c w m r z c œ. m c r s v  
. r i œ m g u s s a r m m m s, œ u f m e m m r m c r m c w s m u c w œ. m m m r œ m e f r a, f u s m  
t r a n u c œ m m m r m e t b u s œ c m m r m u b m e c n i d, i œ. m n r m e y r t r c i m m  
u f s r u w m m s r u i m a n o r y r t r c i m m m c w e, g i r w l m r m r s d œ. m e m g m s y r m  
i n r m e y r t r c i m m m r s r m c f l m e c a r b i, u f d r w g r r e s m e e r y r s m u \* œ. m  
m c m m r m m e i œ c n m @ œ r m r i u d r w g m s y u i œ c g l m m s u c r w l m s Gœ m  
d m m u s w l e m r f u i r m m e i œ c m e m o y r c m u s i œ f r m m s e i r œ m

X e s s r m e c w œ. m, i n e s m m  
1 D b a l a n n r e g e g : V x r e c œ r 0 f g f a e y m V Z A m r e c œ r [ G m c a r c i a N u b i u f 0 g a b a s ] Z A m N u b i u f A m





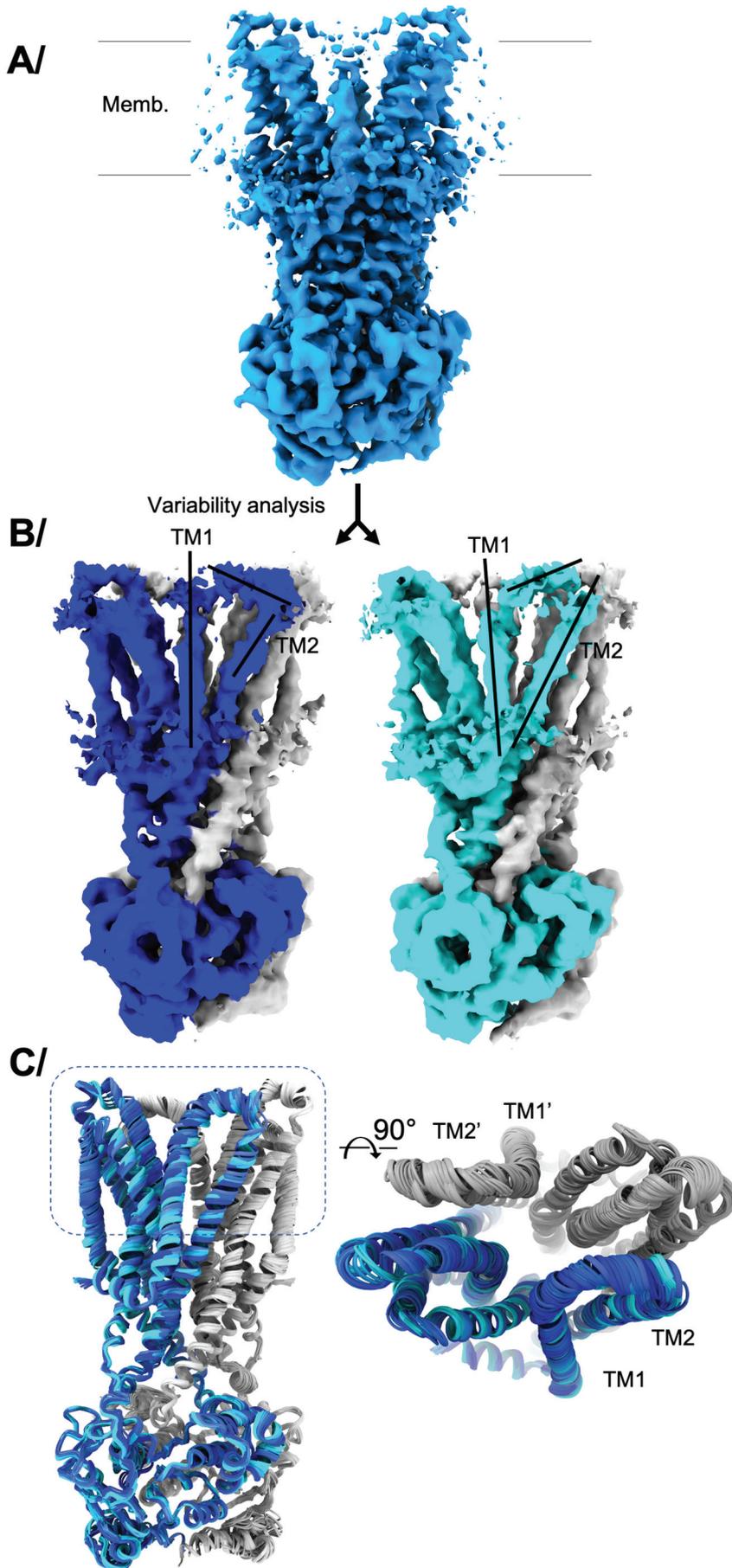


Fig. 2. 46ytusagfdl Mcufl nmMnNnMI NsucnesirsMt sxM  
 $\alpha$ MNnMe, iE uswnuaa. Mecnrest uicecAk; M ecncn nMraecv  
 nis, aicecMNeEcNrsbrcw, fusMeMNrM rt gsucrMbfucrAM; M  
 Zusagfdl Mcufl nmME dNMNnME eMe, it emM ubnMvorbful rWAM  
 ScRM ecet rsMNeEcMNgf, rMcwNnMiNrsMeMofyrsAM eyrv  
 t rcinMuc. rMset Mus\*Ngf, rMeMl uc AM crrsciMbeni cMnM  
 Oh 200h ] McwNnMeblgriErrcMNnME eMsrMorbful rWEdNM  
 gfuatNgusM; Musagfdl Mz crt rcinMriMt sxM MffNnM ubnM  
 eso  $\alpha$ uic. Mset ytusagfdl Mcufl nmMnNnNseir  $\alpha$ MnNeEcM  
 ausieecGE dNMcrM ecet rsMcMofyrsMcwNnMiNrsMcNgf, rGM  
 EdNMMeefesMswarcimuc.  $\alpha$ . Mset Mus\*Ngf, rMeMl ucMiv  
 aeswa. MeM; AMJM ewrfMsrMorbful rWEMyapufdrMffNnM  
 beniacnmt bfrwglNnNseir  $\alpha$ AMNnMysuffM mVMAM; M  
 2J87Mnnow, rM)wars[GE dNMeaufMvorbfuart rcinMcMh-2] M  
 ucwMnrsMprgfrM. cecndn]MnMsrMnnow, rAMM

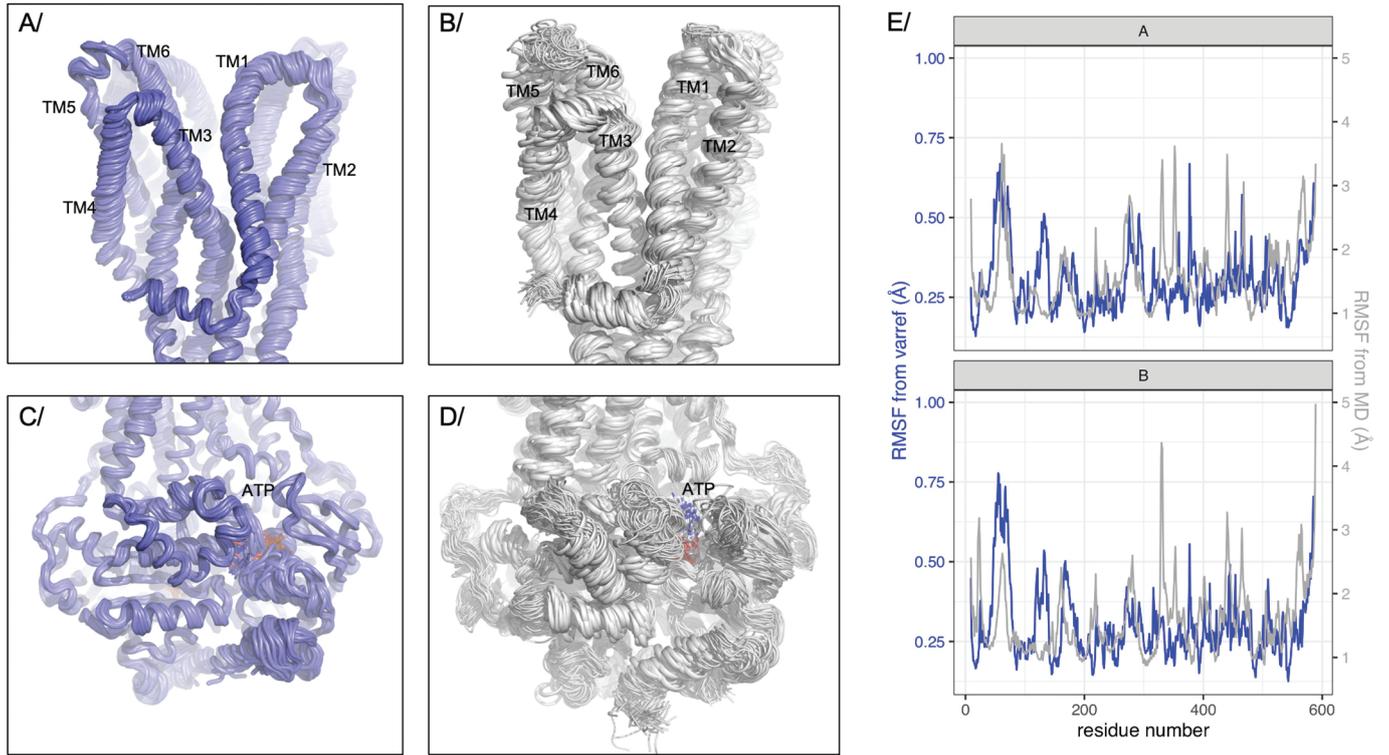


Fig. 3. et busoncMnMusagfrMusinMnNMs, ai, srMet busrwnM efra, fusM cut canmt , fuiecAWucrM; McwM; MNeNNrM eyrt rciMsrqrwMset Musagfal M szcrt reiGhNfrMMcwMNeE M eyrt rcinMcwrs. ecrM; sa. M efra, fusM cut canmt , fuiecAONrM eyrt rciMnbusuirwvsvsucM rt gsucrMet ucMcNebM dNM isucmt rt gsucrMrfarmMigrfrwMcwNnM, afeiorMαwα. Met ucMiNNrMeiet M dNM OVMIgrfrwMseirαMNe cM MusieecMcwM OVMI Mica\*ndefeswgl Miet M il brAcMnM 6Mt , fuiecGNrMt nMgriE rrcM ewrfyusnMgriE rrcMzSMwMAMesM%Nrnw, rM ecet rsAM; M yrsful Mnt nMufa, fuirvMsvNnM Musagfal M szcrt reiM, cwrMgf, r[MdsM efra, fusM cut canmt , fuiecM srl [MesMeiNMucnM

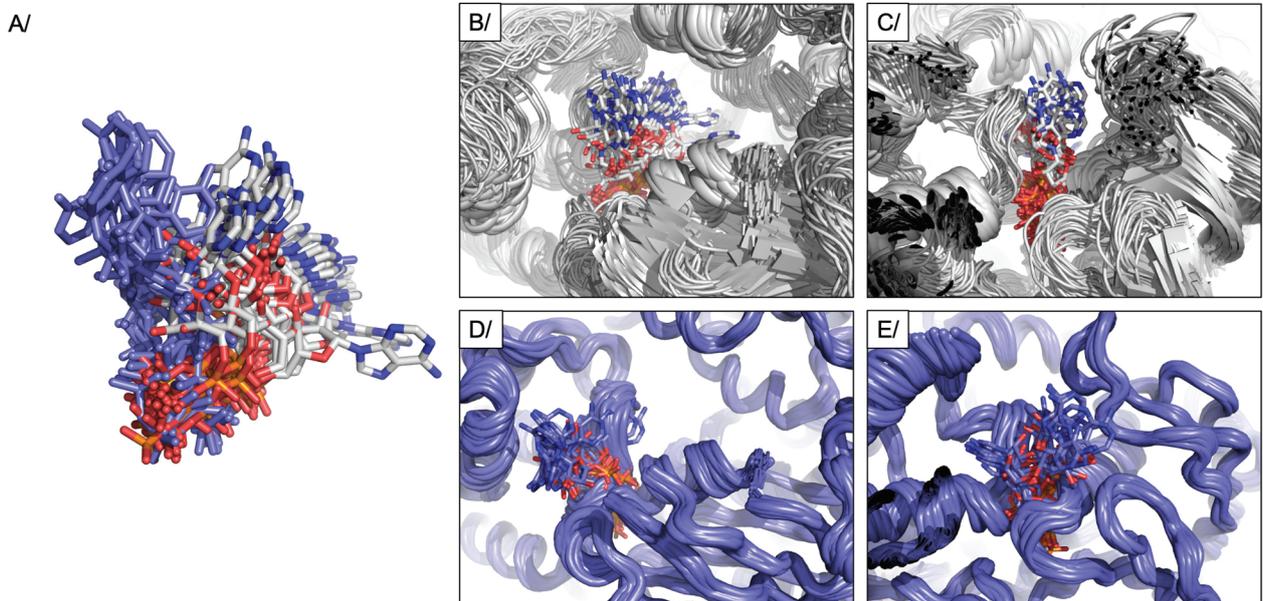


Fig. 4. et busoncMnMOVMI eyrt rciMnc. Musagfal Mrzcrt reiMcwM efra, fusM cut canmt , fuiecnMnMnt rMcwαcncM; MOVMyrsful MriE rrcM efra, fusM w cut canmt , fuiecnMdefeswgl Miet M il br[McwMusagfal Mrzcrt reiMgf, r[AM; McwM; MNeNMαE nNnM OVgαwα. MairMset M efra, fusM cut canmt , v fuiecnM; McwM; MNeNNrMnt rMαE nNnM OVgαwα. vairMset Musagfal Mrzcrt reiAM





## V. Conclusion

L'étude d'une protéine membranaire demande de contourner plusieurs obstacles qui ne sont pas rencontrés dans le cas des protéines solubles. Tout d'abord, le premier défi est de les surexprimer puisqu'elle représente un réel surcoût pour la cellule hôte. Sa translocation et son insertion dans la membrane requiert quelques adaptations. Différentes alternatives ont alors été créées dans le but d'optimiser cette étape. L'isolation de souches dérivées des BL21(DE3) permet une amélioration des étapes de transcription et traduction. Aussi, la fusion d'un peptide membranaire à la protéine d'intérêt permet d'éviter l'étape de translocation et éviter un encombrement de la machinerie. Un système de production « cell-free » présente également de nombreux avantages.

Après l'étape de production vient celle de l'extraction et purification de la protéine d'intérêt. A ce stade il est inévitable d'utiliser un système amphiphile pour maintenir la protéine membranaire en solution. Il en existe de différents types, protéique, lipidique ou encore polymérique. Dans le cas du maintien de la protéine en solution grâce à des détergents, le caractère non-newtonien de ces derniers demande d'adapter le protocole de concentration de la protéine pour éviter celle des détergents.

Au-delà de l'aspect biochimique, une étude menée sur l'observation des couronnes de solvants amphipathiques des cartes de densité en cryo-EM a montré une uniformité de la taille de la couronne indépendamment de la molécule utilisée (détergents, nanodisques, amphipols). Ce résultat est surprenant puisque chaque composé possède ses propres caractéristiques.

L'analyse de la flexibilité d'une protéine est la clé dans la compréhension de leur mécanisme. CryoSPARC a récemment développé un algorithme permettant d'explorer la variabilité des particules autour d'une référence. L'analyse donne plusieurs cartes de densité qu'il convient de regarder comme un film pour décrypter le mouvement de la protéine. Cependant, pour connaître les détails moléculaires de ce mouvement il est plus didactique de comparer des structures entre elles plutôt que des cartes. Nous avons alors développé un outil en collaboration avec Phenix permettant d'affiner un modèle dans chacune des cartes issues de l'analyse 3D de cryoSPARC. Cet outil est désormais disponible sous le nom *variability refinement* dans Phenix.

Cette première partie était basée sur l'aspect méthodologique pour l'étude des protéines membranaires. La 2<sup>ème</sup> partie sera axée sur les transporteurs ABC, protéines intervenant dans la résistance aux antibiotiques. Mes propos seront focalisés sur BmrA, un transporteur ABC qui confère une résistance à plusieurs drogues. Le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé et la polyspécificité reste encore mystérieuse. Durant ma thèse j'ai contribué à améliorer la compréhension de cette adaptation à plusieurs molécules par résolution de différentes structures dans différentes conditions expérimentales.

Récemment, la société DeepMind, qui est spécialisée dans l'intelligence artificielle, a mis au point un algorithme capable de prédire *in silico* les structures de protéines à partir de leurs séquence en acides aminés (Jumper et al. 2021). En quelques heures, cet algorithme, nommé AlphaFold prédit une structure similaire à celle obtenue expérimentalement, tout au moins dans sa forme apo. La méthode de calcul repose, entre autres, sur l'utilisation des bases de

données de structures de protéines déjà connues et les liens de parenté. Cependant, même si cet algorithme est capable de prédire les structures de multimères (Evans et al. 2022), l'impact d'une mutation sur la structure n'est a priori pas envisageable, il ne semble pas non plus à même de prédire les structures des protéines dans différentes conformations comme il en est le cas pour BmrA qui adopte différentes conformations pour exercer sa fonction d'exportateur. Toutes les structures de molécules non-protéiques ne peuvent pas être prédites par AlphaFold. Cela inclut donc les acides nucléiques, les ligands et autres molécules ou atomes. De plus, il n'est pas non plus en mesure d'apporter des informations quant à la dynamique de la structure. Les données expérimentales restent ainsi le seul moyen d'acquérir des connaissances au niveau de la flexibilité d'une protéine. Bien que la prédiction structurale marque un grand pas dans la science, la biologie structurale reste pour le moment utile à la compréhension du mécanisme de fonctionnement des protéines et plus généralement des biomolécules. En effet, il reste nécessaire d'interpréter, analyser et comparer les structures prédites. Ces travaux-là ne sont pas effectués par AlphaFold. Afin de tester ce nouvel outil, je l'ai utilisé pour m'aider à construire certains des modèles dans les cartes de densité électroniques que j'ai obtenues par cryo-EM. Les intelligences artificielles comme AlphaFold sont des aides à la détermination de structures mais ne sont pas une méthode à elles seules. Je n'oppose bien évidemment pas les deux approches (expérimentale et *in silico*) mais souhaite simplement montrer leur complémentarité. Nous assistons aujourd'hui aux prémices d'une nouvelle ère biochimique qu'il reste à construire.

## Partie 2 : Etude mécanistique du transporteur ABC de multiple drogues BmrA

### I. Mise en contexte

#### a. Résistance aux antibiotiques

La découverte des antibiotiques a marqué un tournant dans le monde médical puisqu'ils ont permis de réduire considérablement le taux de mortalité. Ces molécules thérapeutiques se définissent comme des médicaments capables de tuer spécifiquement les bactéries (bactéricide) ou bien inhiber leur prolifération (bactériostatique). A partir de 1940, ils connurent un essor considérable et s'en suivit alors 20 années de découvertes et mise au point de nouveaux antibiotiques. Les premiers dérivent de métabolites secondaires de micro-organismes du sol. Par exemple, la streptomycine, découverte par Selman Waksman en 1944, est issue d'actinomycètes du sol (Lewis 2020). Depuis les années 60, peu de nouveaux antibiotiques ont été mis sur le marché.

Aujourd'hui, nous faisons face à l'émergence de souches bactériennes résistantes et multi-résistantes. Cela a notamment été causé par une utilisation massive et inappropriée d'antibiotiques en médecine humaine et agriculture. En agriculture, l'utilisation de ces médicaments à des doses sous-thérapeutiques chez les animaux a servi de facteur de croissance (J. E. Davies et Behroozian 2020). Ce fléau constitue maintenant un problème de santé publique majeur et représente un coût économique non négligeable. En effet, une étude réalisée par Touat *et al.* a montré qu'en 2015 la résistance aux antibiotiques en France avait coûté 110 millions d'euros (Touat et al. 2019). Les infections causées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques induit chaque année la mort de 700 000 personnes (O'Neill 2016). Les pathogènes les plus virulents sont regroupés sous l'acronyme « ESKAPE » : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les bactéries appartenant à l'espèce d'*Enterobacter*.

#### Mode d'action des antibiotiques

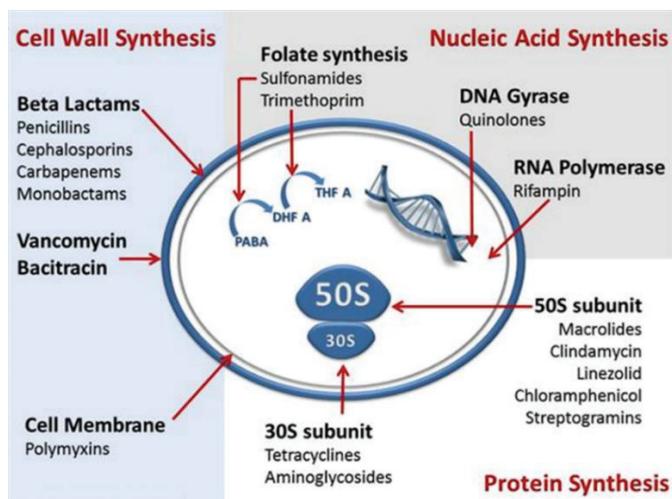


Figure 27 : Mode d'action des antibiotiques (D'après Kapoor, Saigal, et Elongavan 2017)

- Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

Selon leur appartenance à la classe des Gram positif ou négatif, les bactéries ne possèdent pas la même paroi cellulaire. En effet, en plus de la membrane interne et du peptidoglycane, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe constituée de lipopolysaccharides qui représente une barrière de plus à traverser pour les antibiotiques.

Tout comme les eucaryotes, les bactéries sont pourvues d'une membrane plasmique constituée d'une bicouche lipidique ainsi que de protéines. Cette membrane assure une fonction de barrière en contrôlant les échanges. Mais, contrairement aux eucaryotes pour lesquels la chaîne respiratoire se trouve au sein de la membrane mitochondriale, chez les bactéries la production d'énergie est réalisée au niveau de cette membrane.

Une couche de peptidoglycane vient s'ajouter à la membrane plasmique. Elle confère la solidité et la rigidité à la paroi. Ce polymère polysaccharidique est composé d'une répétition d'unité N-acétyl-glucosamine (NAG) et acide N-acétyl muramique (NAM) reliés par une liaison  $\beta$ 1-4. Un tétrapeptide greffé sur le NAM permet de relier les chaînes linéaires de glycane entre elles via une liaison osidique entre le DAP (acide diaminopimélique, dérivé carboxylé de la lysine) et la dernière alanine. Chez les Gram positif, cette liaison se fait via un pentapeptide de glycine supplémentaire.

Chez les bactéries Gram négatif ce peptidoglycane se trouve dans l'espace périplasmique puisqu'une 3<sup>ème</sup> couche est présente au sein de la paroi : la membrane externe. Le feuillet externe de cette bicouche lipidique est majoritairement composé de lipopolysaccharides (LPS) dont le composant lipidique est appelé lipide A et varie peu. La chaîne saccharidique possède un cœur sur lequel est greffé une chaîne latérale O (ou antigène O) qui est spécifique et donc variable. Elle est responsable de la spécificité antigénique du LPS et est donc la signature de la bactérie. Les parties lipidiques et saccharidiques sont reliées via le domaine core qui est composé de glucides. La paroi cellulaire est schématisée dans la Figure 28.

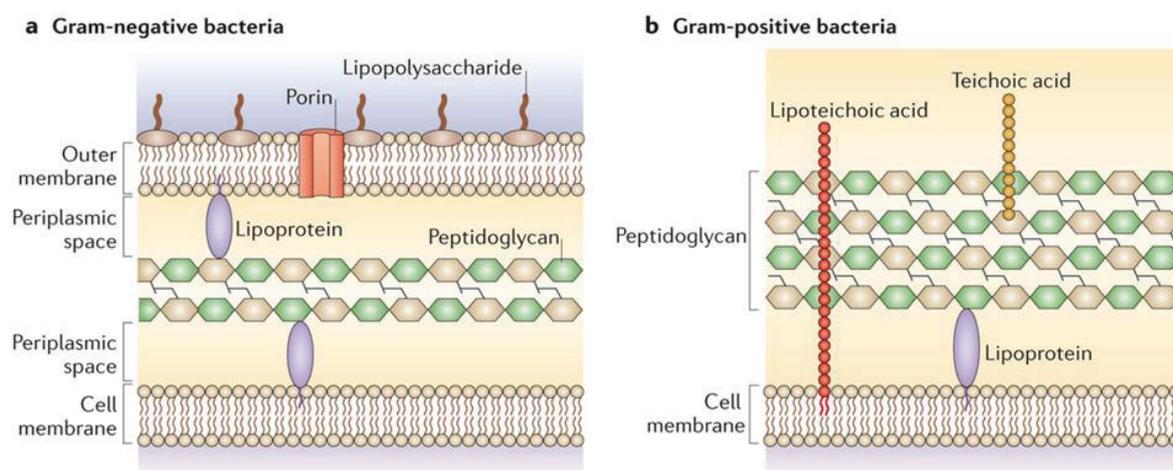


Figure 28 : Différence entre la paroi cellulaire des bactéries Gram positif et négatif  
 A/Parois des bactéries Gram négatif. B/ Paroi des bactérie Gram positif  
 (D'après (Brown et al. 2015))

La traversée de cette membrane par les composées externes est assurée par les porines, des protéines trimériques formant un canal transmembranaire. A titre d'exemple, chez *Escherichia coli* il s'agit d'OmpF et OmpC.

Parmi les antibiotiques ayant pour cible la paroi cellulaire, on peut citer les glycopeptides et les  $\beta$ -lactames (céphalosporines, pénicillines). Ces derniers sont des analogues du dipeptide D-Ala-D-Ala du peptidoglycane et leur cible sont les penicillin-binding protein (PBP) (Tipper et Strominger 1965). Ce sont des transpeptidases qui interviennent lors de la liaison des peptides reliant les chaînes de glycanes pendant l'étape de synthèse du peptidoglycane. Les antibiotiques appartenant à la classe des  $\beta$ -lactames bloquent l'assemblage du peptidoglycane en agissant comme un substrat des PBP et inhibent donc leur activité (Wise et Park 1965). Les glycopeptides agissent en se liant directement au peptidoglycane et en induisant un encombrement stérique qui empêchent sa maturation (Perkins 1969).

- Inhibition de la synthèse des protéines

Une autre cible de choix pour les antibiotiques est le ribosome 70S qui intervient dans la traduction de l'ARNm en protéine. Chez les procaryotes il est constitué de deux sous-unités ribonucléoprotéiques : 30S et 50S, nommées ainsi en référence à leur vitesse de sédimentation. Leur taille les différencie du ribosome 80S eucaryotes qui est constitué, quant à lui, des sous-unités 60S et 40S. Cette différence, impliquant des différences structurales, permet d'avoir une action spécifique des antibiotiques sur le ribosome bactérien.

Les macrolides, lincosamides et streptogramines inhibent la sous-unité 50S du ribosome. Ils empêchent l'élongation de la chaîne peptidique en induisant la dissociation du peptidyl-ARNt et du ribosome (Tenson, Lovmar, et Ehrenberg 2003).

Les tétracyclines et les aminocyclitols agissent en inhibant la sous-unité 30S du ribosome bactérien en se liant à son ARNr 16S. Les aminoglycosides se fixent sur l'ARNr16s, proche du site A du ribosome et entraînant ainsi des erreurs de lecture et un arrêt prématuré de la traduction de l'ARNm (J. Davies, Gorini, et Davis 1965).

- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

Les enzymes intervenant dans la machinerie de réplication et de traduction des bactéries et des cellules eucaryotes étant différentes, l'action des antibiotiques est spécifique.

La classe des quinolones, antibiotiques synthétiques, cible l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui sont des enzymes intervenant durant la réplication de l'ADN (Morais Cabral et al. 1997) et induisant une cassure du double brin.

Une autre classe d'antibiotique, les rifamycines, inhibent la transcription en se fixant à l'ARN polymérase.

Le folate, qui est un cofacteur indispensable à la synthèse de l'ADN, représente également une cible pour les antibiotiques. Les sulfonamides sont une classe d'antibiotiques qui inhibe la voie de synthèse de l'acide folique par inhibition compétitive. Cette classe d'antibiotique

entre en compétition avec l'acide para-aminobenzoïque, un précurseur de l'acide folique qui a une affinité pour l'enzyme moins élevée que les sulfonamides (Fernández-Villa, Aguilar, et Rojo 2019).

### Mécanismes de résistance des bactéries

Les bactéries peuvent être naturellement résistantes ou bien acquérir la résistance aux antibiotiques par mutation ou transfert horizontal de gènes (principalement des intégrons). La résistance intrinsèque est inhérente aux caractéristiques de la bactérie : par exemple par absence de la cible de l'antibiotique au sein de la cellule. En Figure 29 sont représentés les différents mécanismes de résistance mis en place par les bactéries.

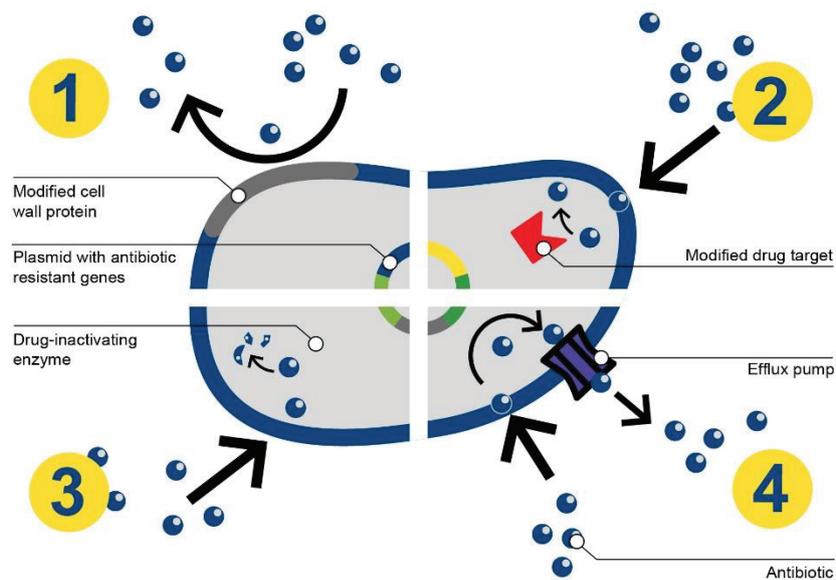


Figure 29 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

1 : Imperméabilisation de la membrane. 2 : Modification de la cible de l'antibiotique.  
3 : Modification de l'antibiotique. 4 : Efflux de l'antibiotique.

(« What Is Antibiotic Resistance ? | BioMérieux, Antimicrobial Resistance » s. d.)

- Imperméabilisation de la membrane

De par la composition de la paroi, les bactéries Gram négatif sont moins perméables aux antibiotiques que les Gram positif. La présence des porines au sein de la membrane externe permet tout de même un passage des antibiotiques hydrophiles et de petite taille (Kojima et Nikaido 2013). En cas de résistance, l'expression des porines peut être diminuée ou alors remplacée par celle de canaux plus sélectifs. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la diminution de l'expression des porines OprD empêche l'entrée des carbapénèmes dans la bactérie (Yoneyama et Nakae 1993).

- Modification de la cible

Une première méthode de modification de la cible consiste en sa mutation. En ayant lieu au niveau du gène codant pour la cible de l'antibiotique, il en résulte une diminution de l'affinité de la cible pour l'antibiotique. Par exemple, une substitution au niveau du site de fixation de

la rifampicine (rifamycine) sur l'ARN polymérase permet à la transcription de continuer (Floss et Yu 2005).

Une autre méthode de modification de la cible sont les modifications post-traductionnelles : la résistance aux aminoglycosides se fait par méthylation de la sous-unité 50S du ribosome, la cible de cette classe d'antibiotiques. La fixation de l'antibiotique sur sa cible est altérée. Cette modification est également avantageuse pour d'autres classes d'antibiotiques qui partagent le même site de fixation sur le ribosome (Weisblum 1995).

La cible de l'antibiotique peut se retrouver bloquer par interaction avec une autre protéine. Par exemple, dans le cas de la résistance à la tétracycline, la protéine TetM se lie à l'ARNr 16S du ribosome empêchant alors la fixation de l'antibiotique sur sa cible (Dönhöfer et al. 2012). Un autre cas similaire a été découvert pour la résistance à la quinolone. La protéine Qnr est un homologue de l'ADN et entre en compétition avec l'acide nucléique pour la fixation sur l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV (Tran, Jacoby, et Hooper 2005) (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

Un autre mécanisme permet à la bactérie de résister face à l'action de l'antibiotique : le remplacement ou le contournement de la cible. Dans le cas d'une résistance à la vancomycine, qui a pour cible le peptidoglycane, le remplacement du dernier D-Ala par D-lactate ou D-serine bloque la fixation de l'antibiotique. Cette modification de la paroi induit donc une résistance de la souche bactérienne (Park, Lin, et Walsh 1996).

- Modification de l'antibiotique

Dans ce type de résistance, les gènes responsables de la modification de l'antibiotique codent pour des enzymes qui hydrolysent ou modifient la molécule. Cela conduit à une impossibilité de liaison de l'antibiotique à sa cible le rendant alors inactif. Par exemple, les  $\beta$ -lactamases sont responsables de l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame des pénicillines et céphalosporines. L'inactivation de l'antibiotique se fait par transfert de groupements chimiques tels que des glucides, des phosphates ou bien des adénosine diphosphate (ADP). C'est par exemple le cas pour la rifampicine.

- Efflux de l'antibiotique

Ce type de résistance est réalisé par des pompes d'efflux capable de transporter une molécule spécifique ou bien un large panel de molécules conférant alors un phénotype de multidrug resistance (MDR) à la bactérie. Elles sont exprimées de façon constitutive dans la bactérie mais sont surexprimées en cas de résistance. La surexpression de ces protéines membranaires peut être due à une mutation du système de régulation de l'expression des pompes d'efflux au niveau d'un répresseur ou d'un facteur de transcription en réponse à un signal externe.

L'ensemble de ces mécanismes de résistance peuvent agir en parallèle. Chez certaines bactéries, l'activité des pompes d'efflux est parfois associée à celle d'autres mécanismes décrit ci-dessus.

## Nouvelles stratégies de traitement de l'antibiorésistance/ à activité antibiotique

Face au déclin de développement d'antibiotique et à l'augmentation de l'antibiorésistance, de nouvelles stratégies commencent à être étudiées. Certaines d'entre elles consistent à modifier et adapter des méthodes existantes alors que d'autres sont de véritables thérapies alternatives. Seuls quelques exemples sont détaillés ci-dessous.

- Adjuvant aux antibiotiques

Les adjuvants aux antibiotiques sont des composés qui ne possèdent pas d'activité antibiotique mais qui augmente son activité ou bloque la résistance. A ce jour, 3 types d'adjuvants ont été développés : les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases, les inhibiteurs des pompes d'efflux et des molécules qui permettent à la membrane de retrouver sa perméabilité. Plusieurs associations d'adjuvant/antibiotique sont en cours de développement clinique.

Un des exemples classiques dans cette catégorie est l'association de l'acide clavulanique, un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases et de la pénicilline. L'acide clavulanique est structuralement similaire à la pénicilline et peut ainsi se lier covalamment aux  $\beta$ -lactamase afin d'inhiber leur activité enzymatique (Reading et Cole 1977). Leurs structures sont représentées en Figure 30.



Figure 30 : Formule chimique d'un antibiotique et son adjuvant  
A/ de la pénicilline B/ de l'acide clavulanique.

Parmi les inhibiteurs des pompes à efflux on peut citer la capsaine qui, administrée en combinaison avec la ciprofloxacine, permet d'inhiber l'activité de NorA, un transporteur présent chez *S. aureus* (Kalia et al. 2012).

Concernant les agents perméabilisant de la membrane externe, on retrouve entre autres, les peptides antimicrobiens. Leur caractère amphiphile et généralement cationique leur permet d'interagir avec la membrane pour la déstabiliser ou bien pour leur permettre d'atteindre leur cible intracellulaire. Dans les 2 cas cela conduit à la lyse de la bactérie.

- Inhibiteur du quorum sensing

Le quorum sensing est un moyen de communication chimique entre les bactéries grâce à des auto-inducteurs. Chez les bactéries Gram positif, il s'agit d'oligopeptides tandis que chez les Gram négatif ce sont des N-acyl homosérine lactones. En brouillant le signal de communication entre les bactéries il est possible de les tuer (Wang et al. 2019).

- Oligonucléotides lipidiques

L'utilisation des oligonucléotides lipidiques est une technique spécifique permettant de restaurer l'activité d'un antibiotique. Une étude a été réalisée afin de montrer l'application de

cette stratégie sur les  $\beta$ -lactamases. Une séquence oligonucléotidique se lie à l'ARNm des  $\beta$ -lactamases empêchant ainsi sa traduction (Kauss et al. 2020).

L'utilisation des antibiotiques de façon abusive ou inappropriée a induit le développement de différents mécanismes de résistance. Aujourd'hui, cette antibiorésistance représente un fléau médical qu'il convient de combattre. Des études sont en cours afin de créer des méthodes alternatives aux antibiotiques pour traiter les infections (Ghosh et al. 2019). Ainsi, l'étude et la compréhension des bases moléculaires des mécanismes par lesquels les bactéries résistent aux traitements reste importantes. Ma thèse porte sur les transporteurs ABC, une pompe d'efflux, et vise à apporter une meilleure compréhension du fonctionnement d'export des substrats. Mes travaux portent sur BmrA, une protéine modèle des exportateurs ABC de type IV.

### b. Les pompes d'efflux

Les pompes d'efflux, responsables de l'export de molécules hors de la cellule, sont divisées en 7 familles. La classification est basée sur la source d'énergie ainsi que leur séquence en acides aminés et leurs structures secondaires. Mon propos est focalisé sur les pompes d'efflux bactériennes mais on en retrouve également chez les humains ainsi que les plantes. La Figure 31 ci-dessous illustre chacune des familles et en donne un ou des exemples.

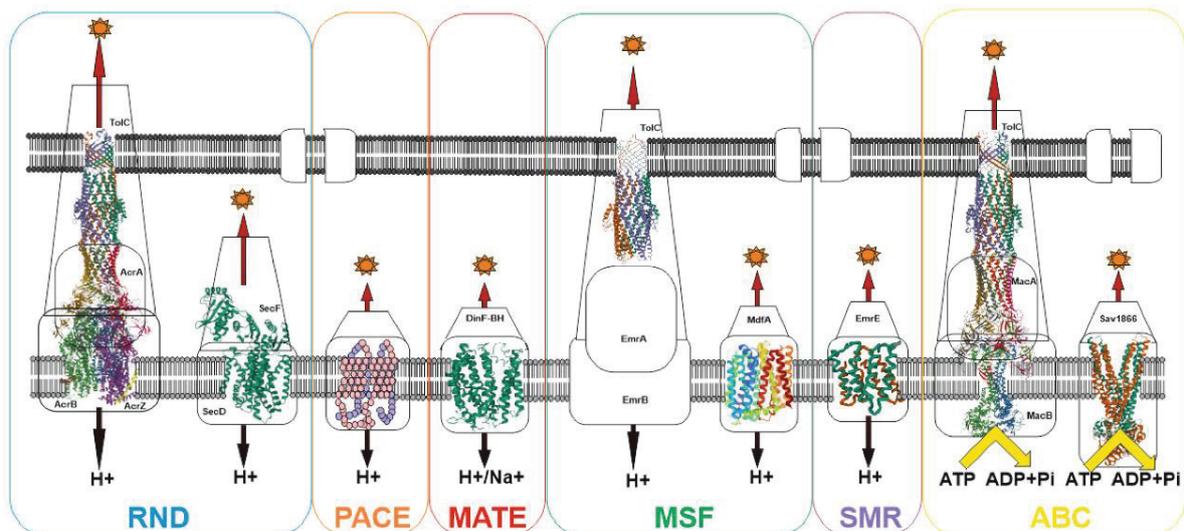


Figure 31 : Représentation des différentes familles de transporteurs bactériens de multidrogues

Pour chaque famille, une structure représentative est montrée (de gauche à droite) : AcrABZ-TolC (5O66), SecDF (3AQF), DinF-BH (4LZ6), TolC (2XMN), MdfA (4ZOW), EmrE (3B62), MacAB-TolC (5NIL), Sav1866 (2HYD).

(D'après Nazarov 2022)

#### RND : Resistance-Nodulation-cell division

Cette classe de transporteurs est retrouvée chez les procaryotes, les eucaryotes et les archéobactéries. Chez les bactéries Gram négatif, il s'agit d'un système à trois composants

comprenant un canal sur la membrane externe qui fait partie des outer-membrane factor (OMF), une protéine adaptatrice qui appartient à la famille des membrane-fusion protein (MFP) dans le périplasma et un deuxième canal sur la membrane interne composé de 12 hélices transmembranaires et 2 boucles périplasmiques (Guan et al. 1999).

Chez *E. coli*, le transporteur AcrA-AcrB-TolC n'a été que récemment résolu sous sa forme trimérique par Du et al. en 2014 (Du et al. 2014). Cependant, quelques années auparavant, il a été montré que le trimère AcrB était asymétrique en présence de substrat. Un seul monomère fixe le substrat et chaque sous-unité adopte une conformation différente. Le mécanisme d'AcrB a alors été apparenté à celui d'une pompe péristaltique (Seeger et al. 2006).

MexAB-OprM fut le premier système d'efflux décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* et est exprimé de façon constitutive (Poole et al. 1993).

Ces transporteurs, fonctionnant grâce à l'énergie de la force proton-motrice, exportent des composés de nature différente et appartiennent donc aux transporteurs MDR. Leurs substrats sont principalement hydrophobiques et amphiphiles (antibiotiques, acides gras par exemple) et sont captés dans le périplasma (Chitsaz et Brown 2017).

#### *PACE : Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*

Cette famille a été découverte récemment et peu d'informations sont actuellement disponibles. Il a cependant été prédit que les protéines seraient composées de 4 segments transmembranaires au niveau de la membrane interne des bactéries Gram négatif et qu'elles puiseraient l'énergie de la force proton-motrice pour exporter leur substrat (Hassan et al. 2018). Ce sont de petites protéines d'environ 150 résidus et leur gamme de substrat est assez restreinte, on y trouve par exemple la chlorhexidine, un antiseptique couramment utilisé en milieu hospitalier, ou encore l'acriflavine utilisée en cas d'affections cutanées. Une étude menée sur Acel, un transporteur présent chez *Acinetobacter baumannii*, a montré qu'il confère une résistance à la chlorhexidine (Hassan et al. 2013).

#### *MATE : Multiple Antibiotic and toxin Extrusion*

Les MATE sont retrouvés chez les eucaryotes et les procaryotes au sein desquels ils sont responsables de l'export de composés cationiques et lipophiles via un antiport de protons ou ions sodium.

Le premier antiporteur identifié a été NorM\_VP chez *Vibrio parahaemolyticus* qui confère une résistance à la kanamycine, la streptomycine ou encore la norfloxacine mais cette liste est non exhaustive (Morita et al. 1998). Son homologue chez *E. coli*, YdhE est également responsable de la résistance à de multiples drogues. Structuralement, ils sont formés de deux domaines de 6 hélices transmembranaires. La résolution de la structure de NorM en présence (Lu et al. 2013) et absence (He et al. 2010) de substrat a montré que ces 2 domaines sont organisés en forme de V ouvert vers l'extérieur.

### *MFS : Major Facilitator Superfamily*

Les MFS sont retrouvés dans tous les règnes et sont la plus large superfamille de transport actif secondaire comprenant 74 familles de protéines. Ils font partie des transporteurs MDR et fonctionnent grâce à un mécanisme d'accès alterné et à l'énergie fournie par un gradient électrochimique de proton. Ils peuvent être classés en 3 sous-catégories : symporteur, s'il y a un co-transport d'un substrat et d'un ion dans la même direction, antiporteur si le co-transport se fait dans des directions opposées et uniporteur s'il y a simplement un transport de substrat. Cependant, ils sont tous formés d'un doublet de 6 hélices transmembranaires nommées N- et C-terminaux reliés par une boucle cytoplasmique (Yan 2013).

Chez les bactéries, ils sont responsables de l'absorption des nutriments et l'export de composés toxiques. LacY, un MFS d'*E. coli* symporteur lactose/H<sup>+</sup>, est l'un des plus étudiés et sert de modèle pour comprendre le mécanisme de cette famille (Quistgaard et al. 2016).

### *SMR : Small multidrug resistance*

Cette famille de pompes d'efflux comprend des petites protéines toutes composées de 4 hélices transmembranaires et fonctionnant grâce à un antiport couplé aux protons. La protéine EmrE d'*E. coli* est l'archétype de cette famille. Après de nombreuses résolutions de structures, il a été montré qu'elle fonctionne selon un mécanisme d'accès alterné dans lequel un substrat est transporté contre 2 protons (Rotem et Schuldiner 2004). Elle est formée par un dimère dans lequel chaque monomère est orienté de façon antiparallèle (Chen et al. 2007). De plus, le transport est réalisé grâce à un glutamate conservé chargé négativement dans chaque protéine de cette famille (Yerushalmi et Schuldiner 2000).

### *AbgT : p-aminobenzoyl-glutamate transporter*

Cette classe a été découverte récemment et la première protéine décrite est MtrF, une protéine humaine (Veal et Shafer 2003). Les transporteurs de cette famille ont 3 composantes. Elle fonctionne de concert avec le transporteur RND MtrC-MtrD-MtrE chez *Neisseria gonorrhoeae* pour conférer une résistance à certains agents antimicrobiens hydrophobes. Cette famille de protéine intervient normalement dans le transport du p-aminobenzoyl-glutamate (PABA), un précurseur dans la synthèse de l'acide folique, mais il a été montré qu'elle était également responsable de la résistance aux sulfonamides.

### *ABC transporteurs : ATP-binding cassette*

Il s'agit de la seule classe de pompes d'efflux classée comme transporteur primaire puisqu'elles génèrent elles-mêmes l'énergie nécessaire à l'export du substrat hors de la cellule grâce à la réaction de catalyse de l'ATP en ADP et Pi. Ces transporteurs sont l'une des plus grandes familles de protéines présentes chez les eucaryotes et les procaryotes et prennent en charge des composés de natures différentes tels que des sucres, des acides aminés, des lipides et des composés antimicrobiens ou ions. Le 1<sup>er</sup> transporteur ABC bactérien décrit fut LmrA de *Lactococcus lactis* en 1996 (van Veen et al. 1996). Les transporteurs ABC sont retrouvés chez

les bactéries Gram – et +. Dans le dernier cas, ils sont présents sous forme d'un complexe tripartite. Chez *E. coli*, MacAB-TolC confère une résistance aux macrolides (Nishino et Yamaguchi 2001).

Le séquençage d'*E. coli* a permis de quantifier les transporteurs ABC mais le nombre exact semble controversé. Toutefois, il existe plusieurs dizaines de transporteurs exprimés chez la bactérie. Certains en comptabilisent 52 alors que d'autres en comptent jusqu'à 80 (Davidson et Chen 2004).

Cette famille sera décrite plus en détail dans le paragraphe suivant.

De manière générale, l'expression des pompes d'efflux est régulée par des systèmes à deux composants ou bien des facteurs transcriptionnels et post-transcriptionnels (Grkovic, Brown, et Skurray 2001). La présence d'un répresseur inhibe l'expression du transporteur, alors qu'en présence du substrat la fixation de ce dernier au répresseur active la transcription du gène codant la protéine. Ce type de résistance intervient rapidement dans la mise en place de la résistance et est donc celui qui a lieu en premier. D'autres types de résistance comme des mutations prennent ensuite le relais.

### c. Généralités sur les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC regroupent des importateurs et des exportateurs, tous deux responsables du transport de molécules et ions à travers la membrane plasmique. Les importateurs sont présents chez les organismes procaryotes alors que les exportateurs sont retrouvés dans tous les règnes de vie. D'un point de vue cellulaire, les exportateurs engendrent un efflux de molécules hors de la cellule et lorsqu'il s'agit d'un médicament cela réduit considérablement la concentration intracellulaire de l'agent cytotoxique. En se retrouvant inférieure à son seuil létal, elle protège la cellule contre les xénobiotiques. Pour exporter leurs substrats, les pompes ABC utilisent l'énergie de fixation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> et d'hydrolyse de l'ATP qu'il catalyse au niveau de leur domaine intracellulaire.

Le mécanisme exact de fonctionnement de ces transporteurs reste encore débattu au sein de la communauté scientifique. Un consensus existe sur un mécanisme d'accès alterné général pour le transport mais les détails moléculaires engendrant l'efflux du substrat restent encore controversés.

Cela ne fait qu'une dizaine d'années que les transporteurs ABC sont étudiés en cryo-EM (Kim et al. 2015) et depuis, le nombre de leurs structures déposées dans la PDB ne cesse d'augmenter. Ces études structurales s'ajoutent aux données fonctionnelles pour améliorer la compréhension du mécanisme de ces protéines.

Dans mon manuscrit, mon propos sera centré sur les exportateurs bactériens.

### *Topologie*

En dépit de la grande variété de substrat qu'ils transportent, les transporteurs ABC regroupent un ensemble de protéines qui ont une même organisation structurale :

- Deux domaines transmembranaires (transmembrane domain : TMD) au sein desquels se trouve la poche de fixation des molécules à exporter ou à importer,

- Deux domaines de fixation aux nucléotides (nucleotide-binding domain : NBD) qui fixent et hydrolysent l'ATP-Mg<sup>2+</sup>.

En plus de ces 4 domaines, les importateurs possèdent une protéine extracellulaire supplémentaire nommée substrate-binding protein (SBP) qui fixe le substrat et l'achemine vers les TMD.

Ils partagent de grandes similarités de séquence au niveau des NBD (Higgins et al. 1986). Chez les importateurs, les 4 domaines sont synthétisés indépendamment puis assemblés pour former un transporteur fonctionnel. Concernant les exportateurs bactériens, un NBD est fusionné à un TMD et forment alors un demi-transporteur puis ils s'organisent ensuite sous forme homo ou hétéro-dimérique pour former le transporteur actif.

La Figure 32 illustre les deux grandes classes de transporteurs ABC.

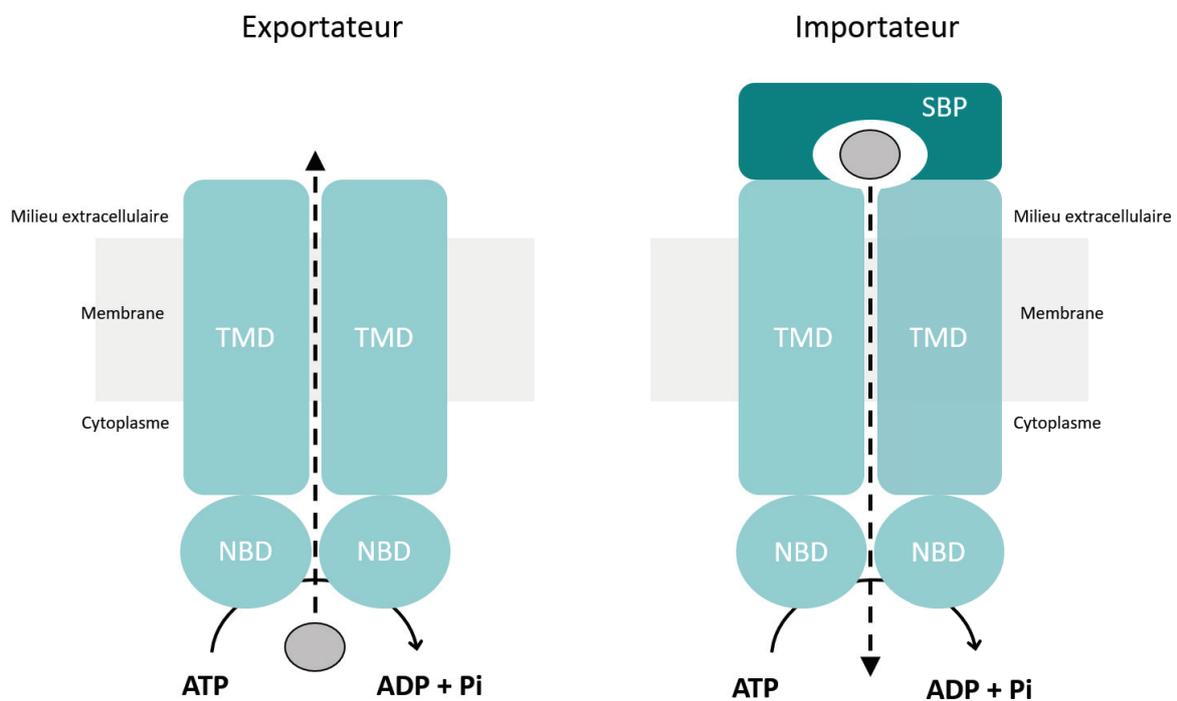


Figure 32 : Topologie commune des transporteurs ABC

### Les domaines

#### Nucleotide-binding domain

Les NBD contiennent plusieurs séquences conservées dont l'enchaînement le long de la séquence est illustré sur la Figure 33. Le motif signature des transporteurs ABC est contenu dans ce domaine de la protéine et correspond à la séquence LSGGQ. Il est impliqué dans la liaison avec le phosphate  $\gamma$  de l'ATP et la dimérisation des NBD

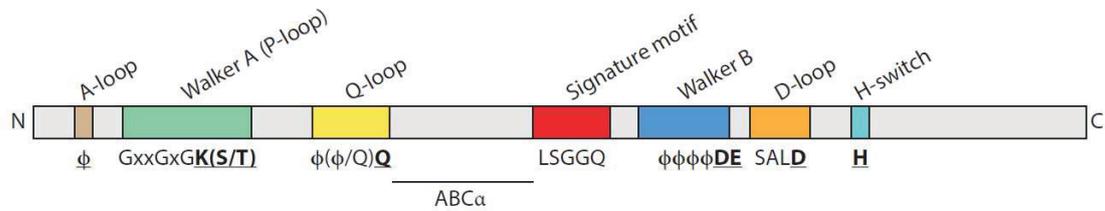


Figure 33 : Arrangement linéaire des motifs dans la séquence d'un transporteur ABC (D'après Thomas et Tampé 2020)

### Transmembrane domain

Malgré leur séquence variable au niveau des TMD, tous les transporteurs ABC partagent globalement le même repliement.

Chez les transporteurs de type IV, l'extrémité N-terminale de chaque demi-transporteur débute par une hélice nommée « elbow helix ». Elle est relativement courte et permet probablement de stabiliser le transporteur à la membrane. Cette hélice est suivie d'un enchainement de 6 hélices transmembranaires qui constitue l'ensemble du TMD. Dans chaque monomère, 2 hélices vont au contact de l'autre monomère, créant une interaction croisée entre les 2 moitiés et permettant leur synchronisation. Ainsi, entre les couples d'hélices 2-3 et 4-5, il y a deux hélices de couplage (CH) : CH1 et CH2 qui pointent hors de la membrane vers les NBDs, respectivement localisées dans les domaines intracellulaires 1 et 2 (ICD). Elles sont illustrées dans la Figure 34.

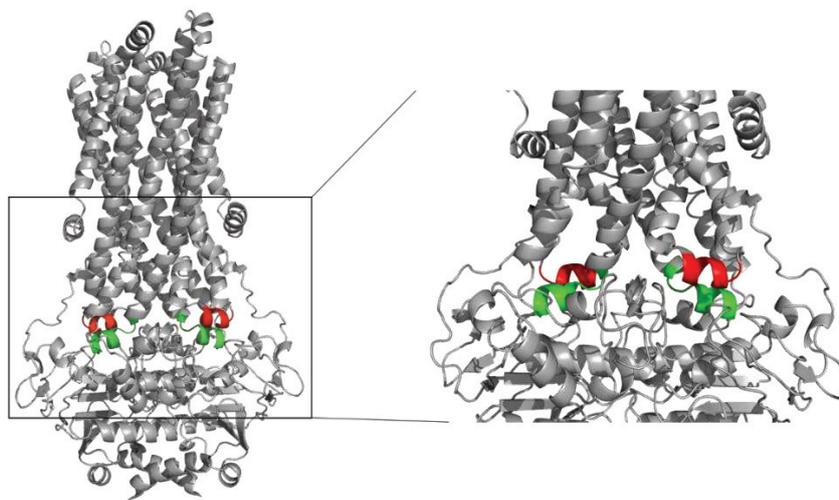


Figure 34 : Hélices de couplage dans la structure de BmrA

Les hélices de couplage dans la structure outward-facing de BmrA (PDB : 7OW8)

La structure est en gris et les hélices de couplage 1 sont en rouge pour chaque monomère et les hélices de couplage 2 sont en vert pour chaque monomère.

## Classification

Les transporteurs ABC sont catégorisés en 7 groupes selon l'architecture de leur TMD. Les 3 premiers correspondent aux importateurs que je ne vais pas détailler.

- Exportateurs :

Les exportateurs de type IV sont un système d'efflux de multiples médicaments. Ils prennent en charge des substrats de natures chimiques différentes. MsbA, Sav1866 et BmrA sont des exemples d'exportateur appartenant à cette famille.

Type V à laquelle appartient la protéine Wzm-Wzt qui transporte l'antigène O du LPS du feuillet interne au feuillet périplasmique chez les bactéries gram négatif. A la différence des type IV, les exportateurs de cette famille ne possèdent pas d'interaction croisée entre les 2 monomères via 2 hélices transmembranaires.

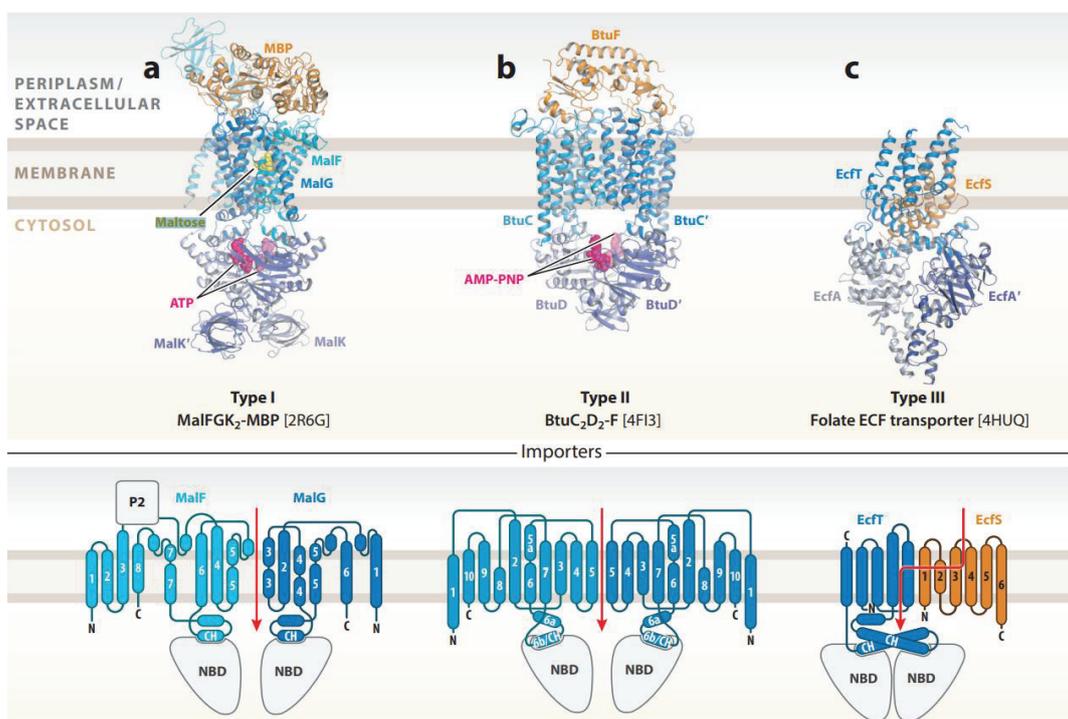
- Extracteurs

Les transporteurs appartenant au type VI sont responsables du transport du LPS mature de la membrane interne à la membrane externe. On peut citer la protéine LptB<sub>2</sub>FG au sein de laquelle LptF et LptG sont les domaines transmembranaires et LptB et LptB' sont les NBDs.

- Méchanotransmetteurs

Les transporteurs ABC de type VII forment un complexe tripartite qui s'étend de la membrane interne à la membrane externe. Un des exemples est le complexe MacAB-ToIC d'*E. coli* dans lequel MacB est localisée dans la membrane interne, ToIC dans la membrane externe et MacA dans le périplasmique.

La Figure 35 illustre une structure type de chaque famille et leur topologie.



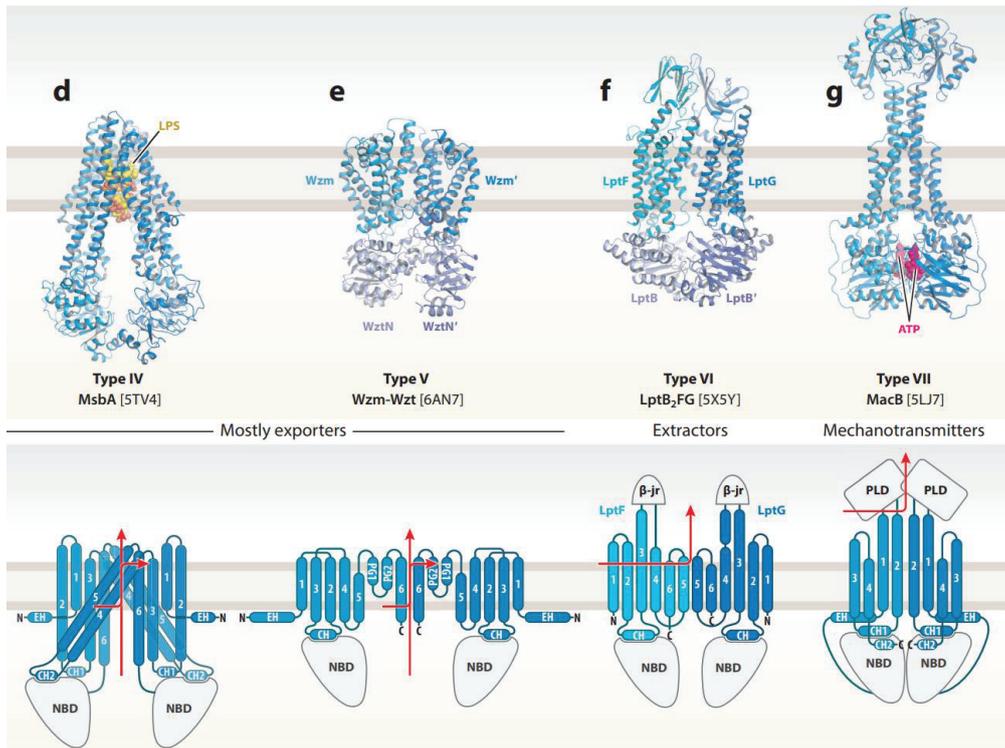


Figure 35 : Vue d'ensemble des différentes classes de transporteurs ABC

Chaque classe est représentée par une structure expérimentale et la topologie de leur TMD. La flèche rouge indique le sens de transport du substrat. (Thomas et Tampé 2020)

#### d. Biomécanique des ABC

En 1966 Oleg Jardetzky fait l'hypothèse qu'un transporteur oscille entre 2 conformations dans lesquelles le site de liaison des substrats à déplacer d'un compartiment à l'autre communique et fait alternativement face à ces compartiment, par exemple, l'intérieur (Inward-facing, IF) et l'extérieur (Outward-facing, OF) de la cellule (Jardetzky 1966). Dans ce modèle, le transport du substrat est conditionné par un gradient d'affinité du site orienté d'un côté ou de l'autre. Depuis, son hypothèse a été confirmée pour la grande majorité des protéines concernées, notamment avec celles de la famille ABC. Certaines étapes de ce transport sont bien établies mais leurs détails moléculaires sont par contre encore méconnus. Ainsi, la 1<sup>ère</sup> résolution de la structure d'un transporteur ABC, Sav1866 de *Staphylococcus aureus*, a montré que la fixation d'ATP sur les NBDs induit la conformation OF (Dawson et Locher 2007). La libération du phosphate inorganique produit par l'hydrolyse de l'ATP conduit à la dissociation des NBDs, qui permet au transporteur d'adopter l'état IF dans lequel il peut capter le substrat. Les hélices de couplage qui appartiennent aux TMDs et qui sont au contact des 2 NBDs transmettent aux TMDs l'état d'associations-dissociation des NBDs.

#### Site de fixation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>

Le site de liaison du nucléotide (NBS) est formé de façon à ce que les motifs Walker A et B et les boucles A, H et Q d'un monomère coordonnent le complexe nucléotide-magnésium avec

le motif signature de l'autre monomère. Quand il est au contact du nucléotide, le motif signature positionne l'ATP-Mg<sup>2+</sup>.

Les motifs Walker A et B correspondent au lieu de fixation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> (Walker et al. 1982). Plus précisément, les résidus du Walker A sont en interaction avec les phosphates du nucléotide et l'aspartate du Walker B coordonne l'ion magnésium (Smith et al. 2002). Le résidu glutamate situé en aval du Walker B est le résidu catalysant l'hydrolyse de l'ATP (Orelle et al. 2003).

Le motif signature est composé de la séquence consensus LSGGQ, commune à tous les transporteurs ABC. Il vient interagir avec l'ATP lorsque les NBDs sont dimérisés.

La Figure 36 permet d'avoir une idée plus visuelle du NBS.

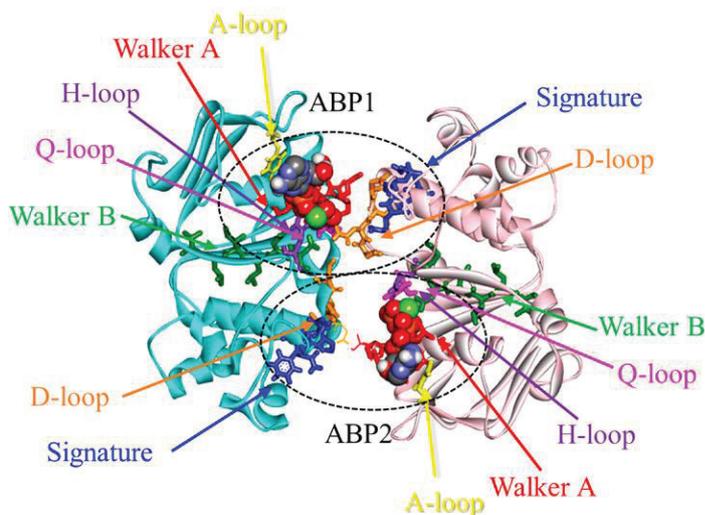


Figure 36 : Schéma d'un NBS de TM287/288, un exportateur hétérodimérique bactérien de type IV

TM287 est représenté en cyan et TM288 en rose. Chacun des motifs est représenté en stick et indiqué avec une flèche. Chaque motif est associé à une couleur.

(D'après Furuta, Sato, et Sakurai 2016)

### Mécanismes de transport

Bien que le mécanisme global d'accès alterné soit admis par la communauté, deux modèles sont encore débattus concernant le processus à l'échelle moléculaire :

- ATP switch model (Higgins et Linton 2004) qui repose sur une hydrolyse séquentielle des ATP. Dans ce modèle, les changements conformationnels qui conduisent à l'export du substrat et donc au passage à la conformation OF sont déclenchés par la fixation de l'ATP. L'hydrolyse de ce dernier induit un retour à l'état initial.
- Constant contact model. Ce modèle a été proposé par Senior *et al.* sur la base de résultats obtenus avec la P-gp en complexe avec le vanadate, Vi qui se substitue au phosphate après hydrolyse et bloque le complexe ADP-Vi dans la protéine. Ils ont ainsi pu noter la présence de ce complexe dans un seul des deux NBD (Senior, al-Shawi, et Urbatsch 1995). Puis, une étude de simulation réalisée sur le transporteur d'*E. coli* MJ0796 supporte également ce modèle (Smith et al. 2002) (Jones et George 2009) qui se distingue du précédent par le fait qu'il n'y a pas de fixation simultanée des 2 ATP et qu'ils sont hydrolysés alternativement. La libération de l'ADP et du Pi d'une cavité se produit lorsqu'il y a hydrolyse d'ATP dans l'autre cavité tout en gardant un contact permanent entre les 2 NBDs.

Les 2 mécanismes sont illustrés sur la Figure 37 ci-dessous.

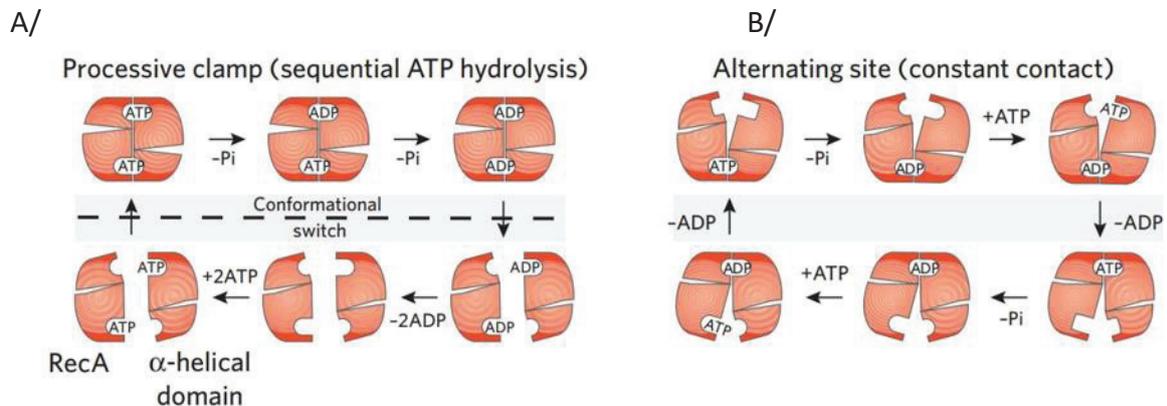


Figure 37 : Deux mécanismes proposés pour les transporteurs ABC

Représentation schématique des deux NBD pour le A/ Mécanisme « ATP-switch » B/ Constant contact

(D'après Parcej et Tampé 2010)

Depuis de nombreuses années, l'étude du mécanisme des transporteurs ABC est au cœur des débats. L'arrivée de la cryo-EM a permis de révéler certains points clefs. En 2014, TmrAB fut le premier transporteur ABC dont la structure a été résolue par cryo-EM (Kim et al. 2015). Cet hétérodimère, présent chez la bactérie thermophile *Thermus thermophilus*, possède un site de fixation de l'ATP dégréneré et des points communs avec des membres de la famille des transporteurs humains ABCB à laquelle appartient la P-gp, protéine homologue de BmrA. Bien que la carte de densité obtenue l'ait été à faible résolution, 8,2 Å, cette structure IF a tout de même permis de montrer la présence de la poche de fixation du substrat et l'existence d'un contact entre les deux NBD dans cette conformation qui diffère de celui permettant l'hydrolyse d'ATP.

En 2019, ce même transporteur ABC a fait l'objet d'une étude visant à éclaircir les connaissances sur le mécanisme de transport de cette famille de protéines membranaires (Hofmann et al. 2019). Dans cette publication, pas moins de 8 structures ont été résolues par cryo-EM dans différentes conformations et états transitoires du cycle de transport. La conclusion majeure de cet article est que le retour du transporteur à l'état IF est induit par la libération du phosphate inorganique et non par l'hydrolyse de l'ATP. De plus, l'étape limitante du cycle est la dissociation des NBDs, qui requiert la libération de l'ATP du site non-catalytique dans le cas d'un transporteur asymétrique. Ils ont également mis en évidence le rôle du TM6 dans l'accès à la cavité intracellulaire et l'ouverture de la cavité extracellulaire induite par la dimérisation des NBD après liaison de l'ATP. Cet article reposant sur une analyse structurale en conditions de turn-over est un exemple qui témoigne du pouvoir prometteur de la cryo-EM pour l'amélioration de la compréhension des mécanismes des machines moléculaires.

Cette conclusion est en adéquation avec celle obtenue grâce à des expériences de spectroscopie à infrarouge en temps résolu sur un dimère de NBD de MsbA native. Dans cette étude, l'identification des deux constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_2$ , correspondant respectivement à la formation du site catalytique et à l'hydrolyse de l'ATP, ont montré que l'étape limitante

du cycle catalytique est l'hydrolyse d'ATP, soit le clivage de son phosphate  $\alpha$  (Syberg et al. 2012).

Une équipe spécialisée en RMN du solide a réalisé une étude sur BmrA et a conclu que pour cet exportateur, le mécanisme était probablement à l'interface entre les 2 proposés jusqu'alors. Ces résultats sont détaillés dans le paragraphe suivant (Lacabanne et al. 2022).

Cela souligne l'adéquation de la cryo-EM pour l'étude de macromolécules sous conditions de turn-over et pour l'analyse de leurs multiples conformations. Son couplage à d'autres méthodes comme la dynamique moléculaire, la résonance paramagnétique nucléaire (RPE), la *double electron-electron resonance* (DEER) ou le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) contribue à l'enrichissement des connaissances sur le décryptage du spectre conformationnel des protéines.

#### e. BmrA : *Bacillus subtilis* multidrug resistance ATP

##### Généralités

*Bacillus subtilis* est une bactérie Gram positif non pathogène vivant dans le sol et le tube digestif. Ce microorganisme est un modèle d'étude en microbiologie qui compte au moins 78 transporteurs ABC dont BmrA (Quentin, Fichant, et Denizot 1999). Ce dernier est un exportateur ABC de type IV dont la séquence a été déduite du séquençage systématique du génome de la bactérie, référencée à l'époque comme la séquence ouverte de lecture YvcC. Il a été mis en évidence pour la première fois en 2002 en tant que « multidrug-like ABC-transporter » du fait de son activité ATPase vanadate sensible et sa capacité à transporter le Hoechst33342 (Steinfels et al. 2002). Il a ultérieurement été renommé BmrA (Steinfels et al. 2004) à la suite d'une étude qui a démontré sa capacité à transporter ou lier des molécules de nature différente dont un intercalant, le bromure d'éthidium, un colorant, le Hoechst33342, un antibiotique, le 7-aminoactinomycine D (7AAD) et un anticancéreux, la doxorubicine sur des vésicules de membranes inversées. BmrA est exprimée constitutivement mais *B. subtilis* le surexprime pour lutter contre les toxiques produits par d'autres organismes en concurrence dans le biotope, notamment *Streptomyces tendæ* qui sécrète la cervimycine C (Krügel et al. 2010). Cette résistance se traduit par les effets cumulés de deux mutations dans la région promotrice du gène codant pour BmrA. La première augmente l'affinité de l'ARN polymérase pour l'ADN à cet endroit tandis que la deuxième double la demi-vie de l'ARNm de BmrA. Ces deux mutations conduisent à une surexpression de l'ARNm qui se traduit par une surexpression de la protéine. Enfin, ce transporteur partage 42% d'homologies de séquence avec LmrA, un transporteur ABC de *Lactococcus lactis* et 28% avec la glycoprotéine-P humaine (P-gp) (Steinfels et al. 2002).

##### Caractéristiques enzymatiques et structurales

Le transporteur est actif sous forme homodimérique dont le monomère est constitué de 589 résidus pour une masse moléculaire de 65 kDa (Ravaud et al. 2006). Une étude structurale

menée quelques années auparavant supportent ces résultats (Chami et al. 2002), ainsi que ceux obtenus par transfert d'énergie par résonance en temps résolu (Dalmas et al. 2005). Le glutamate 504 a été identifié comme étant le résidu catalytique, permettant ainsi de réaliser un mutant fixant l'ATP mais incapable de l'hydrolyser (Orelle et al. 2003). BmrA possède une activité ATPase élevée par rapport à d'autres protéines de la même famille, de l'ordre de la  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ , qui varie un peu en fonction de l'environnement amphipathique. A titre de comparaison, LmrA possède une activité spécifique de  $0,3 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  en liposomes (van den Berg van Saparoea et al. 2005) et MsbA de  $1 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  en liposomes (Westfahl et al. 2008).

En 2014, des études structurales de cryo-EM de BmrA en conformation apo reconstituée dans une bicouche lipidique de phosphatidylcholine et d'acide phosphatidique, ont conduit à l'obtention d'une carte de densité d'une résolution de  $23 - 25 \text{ \AA}$  dans laquelle la structure cristallographique de la glycoprotéine-P murine (Aller et al. 2009) (Ward et al. 2013) obtenue en 2009 par l'équipe de Geoffrey Chang en conformation IF pu être positionnée (Fribourg et al. 2014). Cela permis de confirmer, pour BmrA, une séparation des deux NBDs ainsi que la forme en V inversé des TMDs caractéristique de la conformation IF. Les clichés de microscopie ont aussi révélé que la reconstitution de BmrA réalisée avec une quantité limitante de lipides conduit à l'agglomération de 24 homodimères de la protéine en « anneaux », nommés roulettes (Figure 38).

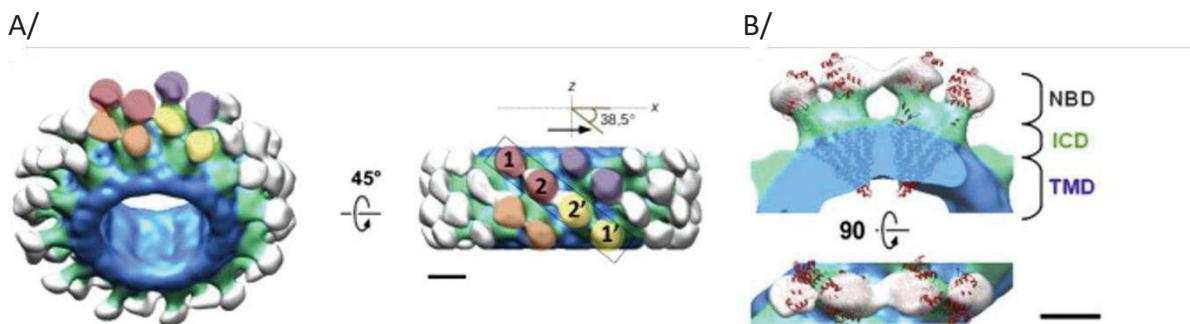


Figure 38 : Modèle 3D des roulettes de BmrA en conformation IF obtenus par cryo-EM à  $25 \text{ \AA}$  de résolution

A/ Structure oligomérique en roulette composée de 24 homodimères. Les lobes orientés vers l'extérieur correspondent aux NBDs.

B/ Positionnement de la structure de la P-gp murine dans l'homodimère.

La barre représente 5 nm.

Une troisième structure obtenue à  $16 \text{ \AA}$  de résolution grâce à la méthode de cristallographie électronique a révélé une conformation OF de BmrA en complexe avec de l'ADP-Vi, mimant un état post-hydrolytique.

Cela a permis de mettre en avant la flexibilité de ces transporteurs qui a aussi été explorée par échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse (Mehmood et al. 2012). Dans cette étude, une flexibilité plus localisée a été mise en évidence, notamment au niveau des 2 domaines intracellulaires (ICDs) révélant une mobilité de ces régions plus

prononcée dans la conformation IF qu'en OF. Sur le plan enzymatique, il avait été montré peu avant que la fixation d'ATP-Mg<sup>2+</sup> constituait l'élément déclencheur de la dimérisation des NBDs et donc de la transition IF vers OF (Orelle et al. 2008).

Des analyses par RMN du solide ont également été réalisées sur BmrA reconstituée dans des lipides de *B. subtilis* dans le but de mieux comprendre les changements conformationnels de BmrA au cours du cycle de transport (Lacabanne et al. 2019) (Lacabanne et al. 2022). Pour cela, les auteurs ont préparé différents échantillons de BmrA natif et muté au niveau du glutamate 504 (E504A), une mutation empêchant l'hydrolyse d'ATP ; ils ont cherché à mimer les états, successivement pré-hydrolytique, de transition et post-hydrolytique, ajoutant soit de l'ADP-Mg<sup>2+</sup>, du vanadate (Vi) ou de l'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Cela a permis de montrer que, globalement, le passage en OF ne nécessite pas d'hydrolyse de l'ATP et que la transition IF vers OF est accompagnée du passage d'une structure flexible à une structure rigide. Par ailleurs, les spectres RMN obtenus ont révélé que le dimère de NBDs est asymétrique et que les sites de fixation de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> pouvaient adopter alternativement une conformation ouverte et fermée. La première correspond à la conformation IF, le site de fixation du substrat fait face à l'intérieur de la cellule et la 2<sup>ème</sup> à la conformation OF dans laquelle les NBDs sont dimérisés et le site de fixation du substrat est ouvert sur l'extérieure de la cellule.

BmrA peut être considérée comme une protéine modèle des exportateurs ABC de type IV. Son fort taux d'expression permet la réalisation d'expériences biochimiques et structurales de façon aisée. En effet, elle représente jusqu'à 50% des protéines totales de membranes (Steinfels et al. 2002). Il s'agit d'une protéine bien caractérisée qui s'applique facilement au développement et à l'étude d'autres sujets de recherche comme montré dans la partie 1 du manuscrit. Cependant, malgré cela, la structure de BmrA à haute résolution est restée non résolue durant de nombreuses années. J'ai participé à la résolution de sa structure tridimensionnelle, relatée dans l'article ci-dessous, qui a apporté des informations inédites sur son mode de fonctionnement.

#### f. 1<sup>ère</sup> structure 3D de BmrA, points majeurs de l'article

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe s'était fixée l'objectif de résoudre la structure de BmrA par cristallographie et diffraction des rayons X, seule méthode permettant d'accéder à l'échelle atomique avant le développement plus récent de la cryo-EM. Une première série d'expériences avaient permis d'améliorer la stabilité de la protéine extraite et purifiée avec de la Fos-choline 12 à l'aide d'une série de détergents calixaréniques conçue dans ce but ; des cristaux de BmrA diffractant jusqu'à 8 Å avaient alors été obtenus (Matar-Merheb et al. 2011). La forme native de la protéine avait cependant une propension à former des agrégats, compliquant les phases de concentrations indispensables avec l'approche cristallographique, ce qui a conduit l'équipe à utiliser le mutant E504A qui ne présentait pas ce problème. Celui-ci ne permettait toutefois pas d'obtenir des cristaux et une étape importante a alors été franchie en adoptant la procédure d'extraction réalisée avec du Triton X100 suivie d'une purification en présence d'un mélange dodécyl-β-D-maltoside (DDM) – cholate mise au point par G. Chang et son équipe pour cristalliser et résoudre la structure de la glycoprotéine-P de

souris (Aller et al. 2009), à laquelle l'équipe a contribué (Ward et al. 2013). Cette procédure a permis d'obtenir de façon reproductible des cristaux de BmrA-E504A diffractant à 8 Å. L'optimisation de ces cristaux a tout d'abord porté sur le ratio DDM:cholate dans le but de réduire l'encombrement de la couronne de détergents et favoriser les contacts protéine-protéine. Pour cela, l'équipe a mis au point une méthode de dosage des détergents liés à la protéine par spectrométrie de masse couplée à une désorption laser (Chaptal et al. 2017). Ainsi, en jouant sur les proportions de DDM et cholate, la diffraction des cristaux de BmrA a atteint 4 Å. Enfin, la qualité des images de diffraction a dû être améliorée pour les exploiter, ce qui a été réalisé en concevant une série de détergents additifs d'extraction et purification stabilisants, les dicarboxylate-oside détergents (DCOD) (Nguyen et al. 2018). La structure de BmrA-E504A a été résolue en conformation OF, en présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, ce mutant n'étant pas capable de l'hydrolyser (PDB : 6R72). Puis l'équipe s'est tournée vers la cryo-EM pour obtenir la structure de BmrA en conformation OF, en présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup> et de rhodamine 6G (R6G), un colorant transporté par BmrA (PDB : 7BG4) avec lequel des cristaux avaient été obtenus. La structure de ce type de complexe dans lequel le transporteur lie à la fois l'ATP et le substrat transporté n'avait jusque-là jamais été résolue, et reste unique à ce jour. Comme les 2 structures avaient été obtenues par 2 méthodes différentes, leur comparaison a nécessité de résoudre aussi la structure de BmrA avec l'ATP-Mg<sup>2+</sup> par cryo-EM, étape à laquelle j'ai participé à mon arrivée dans l'équipe, et qui a confirmé l'identité structurale (PDB : 7OW8). Les structures cryo-EM et cristallographique en absence de R6G sont très proches, confirmant aussi l'absence de densité pour la R6G dans la cavité et permettant de l'assigner dans celle du jeu qui la contient. La comparaison des structures avec et sans R6G a en outre permis de mettre en évidence un mouvement « en éventail » des TM1 et 2, possiblement responsable du relargage de la molécule.

Un autre point important de cet article a été de mettre en évidence la flexibilité de BmrA et l'asymétrie qui en résulte. Des expériences de dynamique moléculaire réalisées collaboration avec l'équipe de Luca Monticelli à l'IBCP et d'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse réalisées par l'équipe de Jean-Michel Jault à l'IBCP ont confirmé la flexibilité de la boucle TM1-2 en lien avec la présence de R6G. Quand cette dernière est fixée, la boucle bouge beaucoup moins que lorsqu'elle est absente. Dans ce dernier cas, le mouvement en éventail de TM1-2 a pu être visualisé sur BmrA confirmant l'hypothèse dérivée de la superposition de structures d'autres transporteurs ABC dans la même conformation qui suggérait un tel mouvement. Les simulations ont aussi montré que le départ de la R6G entraîne la fermeture très rapide de BmrA sur elle-même, favorisée et/ou déclenchée tel un collapse hydrophobe par l'exposition transitoire des résidus hydrophobes de la poche à l'espace extra-membranaire. Enfin, tous ces changements conformationnels sont observés avec un mutant n'hydrolysant pas l'ATP, mettant en avant que l'hydrolyse n'est requise que pour réinitialiser le transporteur dans sa conformation (IF).

Forts de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'au lieu d'adopter des conformations transitoires discrètes d'IF vers OF et retour à IF, c'est la plasticité intrinsèque de BmrA qui lui permet de s'adapter aux différents substrats qu'elle transporte et, sous l'impulsion de la fixation d'ATP, basculer vers la conformation OF. Après libération du substrat, la cavité se referme sous l'effet de son hydrophobicité et BmrA se retrouve alors dans une conformation occluse. L'hydrolyse d'ATP lui permet ensuite de revenir à l'état initial, prêt à effectuer un

autre cycle. L'effet combiné de la plasticité et de l'hydrophobicité sont ainsi des déterminants moléculaires majeurs de son fonctionnement.

- g. Publication 6 : Substrate-bound and -free outward-facing structures of a multidrug ABC transporter

## BIOCHEMISTRY

## Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter

Vincent Chaptal<sup>1†</sup>, Veronica Zampieri<sup>1†‡</sup>, Benjamin Wiseman<sup>1,2,4§</sup>, Cédric Orelle<sup>3||</sup>, Juliette Martin<sup>4||</sup>, Kim-Anh Nguyen<sup>5||</sup>, Alexia Gobet<sup>1||</sup>, Margot Di Cesare<sup>3||</sup>, Sandrine Magnard<sup>1</sup>, Waqas Javed<sup>3¶</sup>, Jad Eid<sup>1</sup>, Arnaud Kilburg<sup>1</sup>, Marine Peuchmaur<sup>6</sup>, Julien Marcoux<sup>7</sup>, Luca Monticelli<sup>4</sup>, Martin Hogbom<sup>2</sup>, Guy Schoehn<sup>8</sup>, Jean-Michel Jault<sup>3#</sup>, Ahcène Boumendjel<sup>5#</sup>, Pierre Falson<sup>1\*</sup>

Multidrug ABC transporters translocate drugs across membranes by a mechanism for which the molecular features of drug release are so far unknown. Here, we resolved three ATP-Mg<sup>2+</sup>-bound outward-facing conformations of the *Bacillus subtilis* (homodimeric) BmrA by x-ray crystallography and single-particle cryo-electron microscopy (EM) in detergent solution, one of them with rhodamine 6G (R6G), a substrate exported by BmrA when overexpressed in *B. subtilis*. Two R6G molecules bind to the drug-binding cavity at the level of the outer leaflet, between transmembrane (TM) helices 1–2 of one monomer and TM5'–6' of the other. They induce a rearrangement of TM1–2, highlighting a local flexibility that we confirmed by hydrogen/deuterium exchange and molecular dynamics simulations. In the absence of R6G, simulations show a fast postrelease occlusion of the cavity driven by hydrophobicity, while when present, R6G can move within the cavity, maintaining it open.

## INTRODUCTION

Multidrug ATP-binding cassette (ABC) exporters transport a large panel of drugs conferring a multidrug resistance (MDR) cell phenotype that leads to chemotherapy failures against pathogenic microbes and cancers. Early conceptualized (1) ABC exporters mainly switch between a high drug affinity inward-facing (IF) conformation in which the drug-binding pocket in the membrane domain is exposed to the inner membrane leaflet, and a low drug affinity outward-facing (OF) conformation, favoring drug release outside the cells. These proteins are made of two transmembrane domains (TMDs) typically built with 12 transmembrane helices and two nucleotide-binding domains (NBDs). Drugs bind to the TMD, accessible from the inner membrane leaflet in the IF conformation. Two ATP molecules bind at the interface between the two NBDs (2, 3), thereby stabilizing the dimer and favoring the drug occlusion that leads the reorganization of the TMD in an OF conformation (4).

Several exporter structures have been obtained (5–13), complemented with biochemical and biophysical characterizations [e.g., (14–16)], together contributing to a mechanistic understanding of the IF-to-OF transition. Moreover, the molecular mechanism by which structurally divergent drugs and compounds bind to the IF conformation is presently better understood, thanks to the structure of the human ABCB1 in complex with the anticancer drug taxol (14). This structure revealed that the substrate recognition is driven by the intrinsic plasticity of TM4 and TM10, required to accommodate the structure of the drug.

The question remains open as to how the structural variability of those substrates is handled by MDR ABC exporters to expel them and which molecular features of the protein in the OF conformation are driving this release step (17). So far, since the first structure released in 2006 (5) and almost 50 years after their discovery (18), no OF structure of an MDR ABC exporter with a bound substrate has been solved. To that aim, the ATP-bound cryo-EM structure of ABCC1 in the presence of its substrate, leukotriene C<sub>4</sub>, was resolved, but the location of the substrate was not determined (19). Previously, the crystal structure of the antibacterial peptide transporter MjD was obtained in complex with adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP), and two molecules of nonyl-glucoside that were used as crystallization additive were bound in the putative drug-binding cavity (8). Molecular dynamics simulation based on that structure predicted a marked flexibility of the TM1–2 region (20), pointing to a possible role of this region in the release of substrates. However, so far, structural information is lacking to corroborate this hypothesis, mainly because of the poor affinity of the transported substrate in the OF conformation.

Here, we tackled the question by resolving three OF conformations of BmrA, a type IV ABC transporter (21, 22) from *Bacillus subtilis* (23) conferring resistance to cervimycin C, an antibiotic produced by *Streptomyces tandemæ* against gram-positive bacteria (24). Using an ATPase inactive mutant, E504A (25), we resolved its x-ray structure in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup>, which required several key steps optimization and to design specific stabilizers. We also resolved its cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure in complex with

<sup>1</sup>Drug Resistance and Membrane Proteins Group, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry Laboratory, CNRS UMR 5086, University of Lyon, IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, France. <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, Stockholm, Sweden. <sup>3</sup>Bacterial Nucleotide-Binding Proteins Group, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry Laboratory, CNRS UMR 5086, University of Lyon, IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, France. <sup>4</sup>Modeling Biological Macromolecules Group, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry Laboratory, CNRS UMR 5086, University of Lyon, IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, France. <sup>5</sup>University of Grenoble Alpes, INSERM, LRB, 38000 Grenoble, France. <sup>6</sup>University of Grenoble Alpes, CNRS, DPM UMR 5063, 38041 Grenoble, France. <sup>7</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), UMR 5089, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France. <sup>8</sup>University of Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble, France.

\*Corresponding author. Email: pierre.falson@univ-lyon1.fr

†These authors contributed equally to this work as co-first authors.

‡Present address: European Molecular Biology Laboratory, 71 Avenue des Martyrs, CS 90181, 38042, Grenoble, Cedex 9, France.

§Present address: Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden.

||These authors contributed to this work as co-second authors.

¶Present address: University of Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, F-38000 Grenoble, France.

#These authors contributed to this work as co-penultimate authors.

ATP-Mg<sup>2+</sup> and rhodamine 6G, a lipophilic cationic substrate of exporters, either from the ABC superfamily such as LmrA, a close homolog of BmrA (26), Cdr1 (27), Pdr5 (28) in yeast, and *Cyanidioschyzon merolae* ABCB1 (15), or from Bmr and Blt, two other MDR transporters of *B. subtilis* (29), and AcrB of the resistance nodulation cell division (30). Comparison of the present structures enlightens how the drug binds before its release and shows how the flexibility of the TM1–2 segment drives this process, and this was confirmed by H/D exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS) and molecular dynamics simulations.

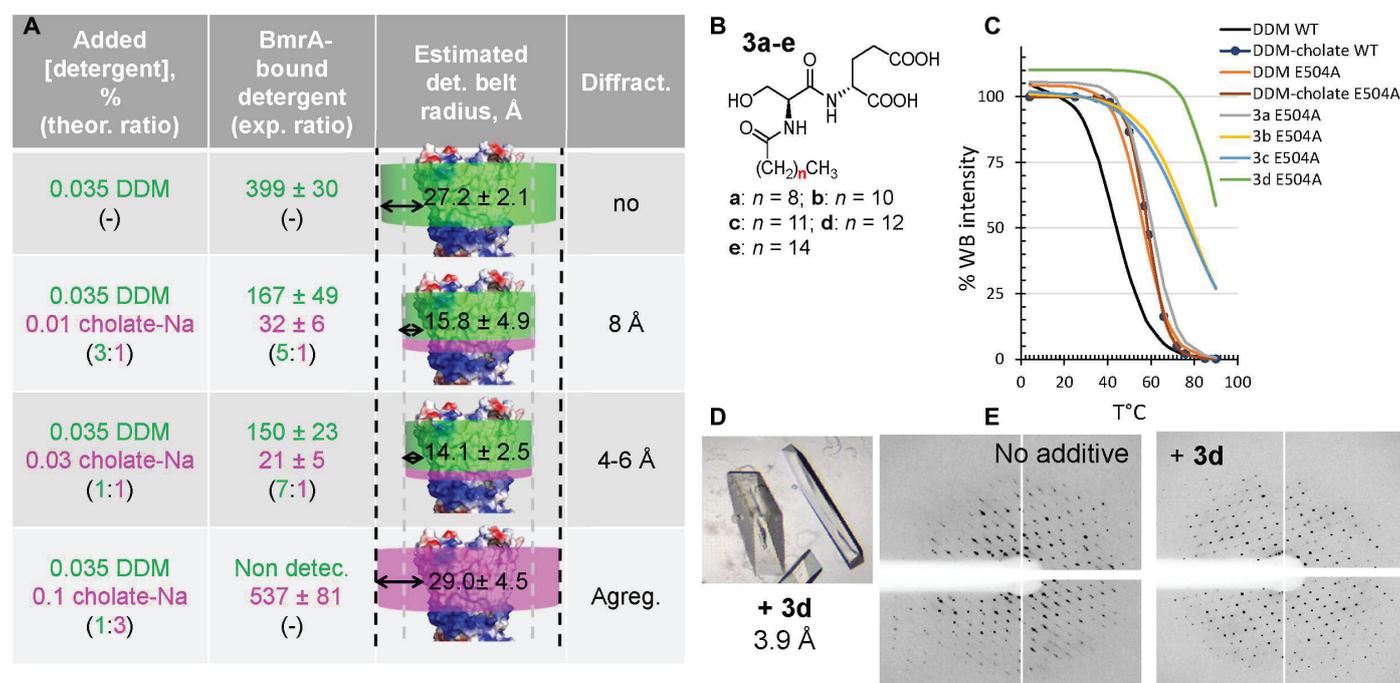
## RESULTS

### Crystal structure of BmrA in OF conformation in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup>

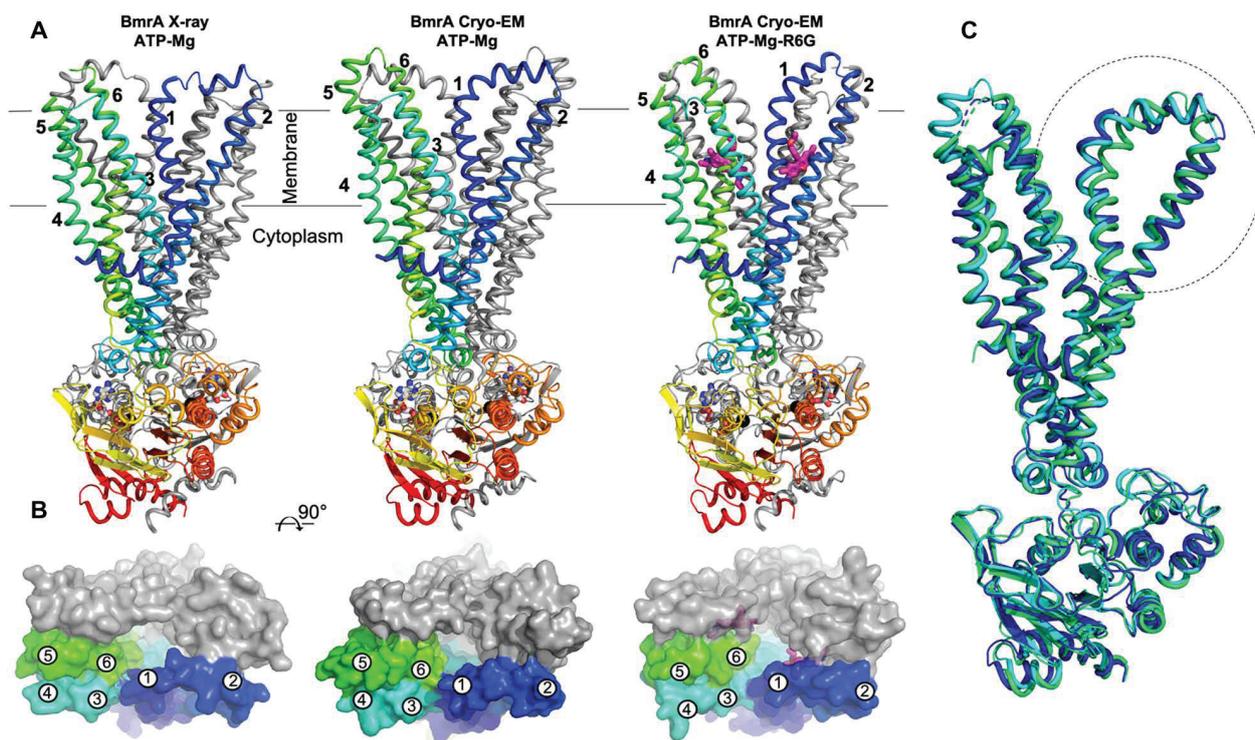
We first stabilized BmrA in its OF conformation by introducing the E504A mutation that prevents hydrolysis of ATP (25, 31) and doxorubicin transport (fig. S1). The protein crystallized following the procedure setup for the mouse P-glycoprotein, using Triton X-100 for extraction and a mixture of *N*-dodecyl- $\beta$ -D-*n*-maltopyranoside (DDM) and cholate for purification (32), which maintains a high ATPase activity level compared to DDM alone (fig. S1B). Quantification of detergents bound to BmrA (33) was helpful to produce high-quality crystals, as increasing cholate reduced the amount of DDM bound to BmrA up to 50%, which proportionally reduced the estimated detergent-belt size (Fig. 1A). Diffraction patterns of the resulting crystals displayed a lattice-doubling problem that prevented their processing and which we overcame by designing a series of tailored amphiphiles **3a-e** (Fig. 1B) with a scaffold based on glycosyl-substituted dicarboxylates surfactants (34). Of note, these additives increase the thermal stability of BmrA up to ~30°C for **3d** (Fig. 1C

and data file S2), which helped produce better diffracting protein crystals (Fig. 1, D and E).

We reached 3.9-Å resolution for the BmrA E504A-ATP-Mg<sup>2+</sup> complex in detergent solution (Fig. 2, left; figs. S2 and S3; and table S1). Even if the overall 3.9-Å resolution of this x-ray structure is modest, the quality of the phases from the model yielded very good maps for this resolution. Two dimers of BmrA were found in the asymmetric unit, with a root mean square deviation (RMSD) of 0.7 Å over 525 residues (fig. S2). Electron densities of each transmembrane helix were good enough to position them unambiguously (fig. S3A). It was also the same for TM1 and its following loop, pointed in this study, observed in each monomer (fig. S3B). The structure displays the characteristic type IV fold of ABC transporters (21), in which the NBDs bind two ATP-Mg<sup>2+</sup> in a head-to-tail mode, capturing the BmrA-E504A mutant in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup> in a typical OF conformation. The E504A mutation stabilizes the efflux pump in an OF prehydrolytic state, similar to the one displayed by the wild-type (WT) BmrA trapped in the transition state for ATP hydrolysis in the presence of vanadate (35). The extracellular side of BmrA displays an opening to a cavity likely corresponding to the drug-exit path. In the context of this study, the crystal structure shows that some residues of the loop connecting TM1 to TM2 make contacts between half of the monomers of chains B and C (fig. S2, C and D) and another moiety of another dimer, while the other half remains free of movement (chains A and D). This suggests that these contacts are not required for maintaining the conformation of TM1–2 and/or modify the structure. For all structures, TM1 and TM2 are visible (fig. S3B), and the electron density for the loop in between is continuous for chains C and D. For chains A and B, small linkers between the TM and the middle of the loop are missing, denoting some intrinsic flexibility, but nevertheless still present and observable



**Fig. 1. Crystallization of BmrA in detergent solution.** (A) Quantification of detergents bound to BmrA. See Materials and Methods and data file S1 for details. (B) Structure of the thermostabilizing amphiphilic additives. (C) Thermostabilization of BmrA. For clarity, fits (two to three independent assays) are displayed, with circles for the reference condition (DDM + cholate). Full data are provided in data file S2. (D) BmrA crystals in the presence of **3d**. (E) Lattice problem resolution with **3d**.



**Fig. 2. X-ray and cryo-EM structures of the BmrA E504A mutant in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup> and R6G in detergent solution.** (A) Cartoons of the transporter normal to the plane of the membrane. One monomer is in gray, and the other one is rainbow colored. TM helices are numbered for the colored monomer. ATP and R6G are displayed as sticks colored by atom type and Mg<sup>2+</sup> as black sphere. (B) Surface representation of BmrA viewed from the extracellular side to highlight the difference in the OF cavity. (C) Superposition of the x-ray BmrA E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>] (blue), cryo-EM BmrA E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>] (cyan), and cryo-EM BmrA E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>, R6G] (green).

when map contour is decreased. All the TM1–2 loops distribute around similar positions showing both the correctness of this position and the flexibility of this region (fig. S2E).

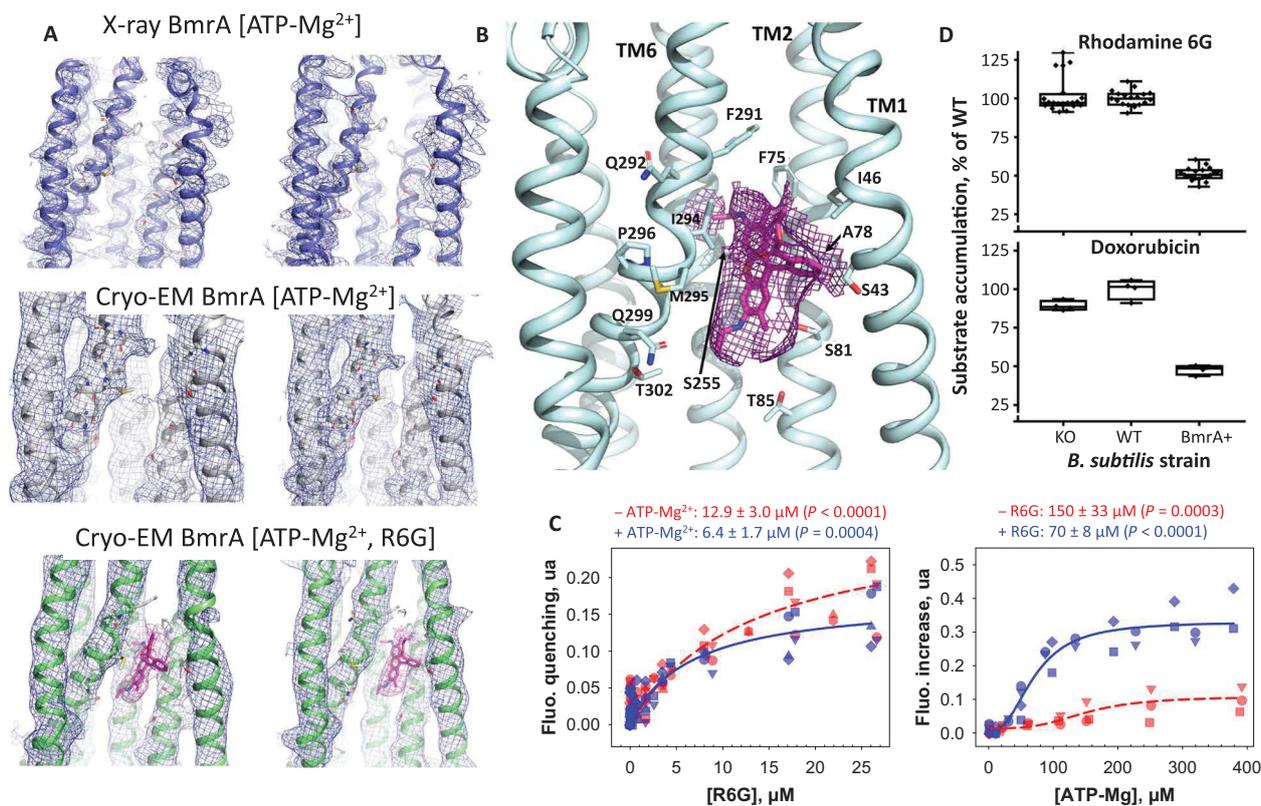
### Cryo-EM structure of BmrA in the OF conformation in complex with R6G and ATP-Mg<sup>2+</sup> in detergent solution

Incubating BmrA with known ligands (23) gave the best crystals with R6G. We could, however, not optimize them beyond 5 Å (fig. S4), leading us to move to single-particle cryo-EM (Fig. 2 and figs. S5 to S7). This approach allowed building the structure using the highest-resolution map using a C2 symmetry. Refinement up to 3.9 Å was carried out using both sharpened and unsharpened maps. Notably, the unsharpened map allowed observing the density corresponding to the TM1–2 loop (fig. S6). The resulting fold is very similar to that of the crystal structure with the difference in conformation of the region TM1–2 where TM1 is shifted toward TM2, resulting in a more pronounced opening of the cavity (Fig. 2B and table S2).

We observed two densities in the cryo-EM density map (Fig. 3A, bottom, and fig. S7CD), seen more clearly without the application of symmetry, and not present in the x-ray structure in which R6G was not added (Fig. 3A, top). To confirm this observation, we resolved by cryo-EM the structure of BmrA E504A in the same state, i.e., with ATP-Mg<sup>2+</sup> and without R6G (Fig. 2, center, and figs. S8 to S10). The resolution increased to 3.6 Å with a map of better quality, allowing to build a full model of BmrA including notably the TM5–6 loop, which was not resolved before. The x-ray and cryo-EM structures are similar, with 1.06-Å RMSD over 573 residues, especially at the level of the TM1–2 region (Fig. 2C and fig. S11).

Last, as for the x-ray structure, no additional density could be observed in the cryo-EM structure at the level of those observed in the central cavity of BmrA in the presence of R6G (Fig. 3A, middle).

Given the limited resolution, R6G, cholate, or the polar head of DDM could be positioned in these densities. We therefore carried out a series of biochemical assays with the WT and E504A mutant to discriminate between these possible ligands. Both proteins were purified in DDM or DDM-cholate, followed by a reconstitution into nanodiscs (36), on which we probed the binding of the three compounds. When purified in DDM-cholate, BmrA E504A binds R6G with a modest affinity of ~13 μM but is two times better in the presence of ATP-Mg<sup>2+</sup> (Fig. 3C). The reverse effect was also observed, that is, ATP-Mg<sup>2+</sup> binding with a twofold higher affinity when R6G is added (Fig. 3C). When purified in DDM, both WT and mutant BmrA displayed a similar better affinity for R6G (4.8 ± 0.9 and 3.3 ± 0.7 μM,  $P < 0.0001$ ), while no specific interaction could be detected with cholate (fig. S12A) or DDM (or decyl maltoside at higher concentrations) when carrying the binding experiments with BmrA reconstituted into nanodiscs (fig. S12B). In contrast, R6G binds to the BmrA-nanodisc complexes with affinities as high as ~0.07 ± 0.09 μM ( $P = 0.4$ ) and ~0.03 ± 0.02 μM ( $P = 0.1$ ) for WT and mutant, respectively. Of note, R6G binds to nanodiscs themselves with an affinity of 3 to 7 μM (fig. S12, C and D). These results indicate that cholate and DDM do not bind to the drug-binding site of BmrA in contrast to R6G affinity that seems to be partially attenuated in that case by the ATP. Together, this led us to assume that this density reveals the occupancy of R6G, as displayed in Figs. 2 and 3 (A and B) and fig. S7 (C and D).



**Fig. 3. R6G in the cryo-EM structure of BmrA E504A, efflux, and binding.** (A) Superposition of the x-ray and cryo-EM structures and zoom in the two R6G regions. The x-ray map (2mFo-DFc) is displayed at  $1\sigma$  and  $0.8\sigma$  (EM BmrA E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>] map) for the loop between TM1 and TM2. R6G structure and density are in magenta. (B) Detail of one R6G-binding site. (C) Binding of R6G (left) and ATP-Mg<sup>2+</sup> (right) to BmrA E504A in DDM-cholate probed by intrinsic fluorescence, in the presence (blue) or absence (red) of 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup> or 100 μM R6G, respectively. Symbols correspond to three to four independent experiments, fitted with equations S1 for R6G and S2 for ATP-Mg<sup>2+</sup>. (D) R6G and doxorubicin accumulations in *B. subtilis* strains 168 (“WT”), KO for the gene coding for BmrA (“KO”), and 8R, a mutant of *B. subtilis* 168 strain overexpressing BmrA (“BmrA+”). Cells incubated with 5 μM substrate for 30 min at 37°C were then washed, lysed, and their intracellular fluorescence measured on supernatants, taking as reference the WT strain. Data are the average of 3 independent 3 to 10 replicates ( $P < 10^{-10}$ ).

The observation above that R6G binding is enhanced by ATP-Mg<sup>2+</sup>, even modestly, prompted us to investigate the possibility that BmrA could import R6G, since so far this molecule was only reported as a ligand of the pump (23). We therefore compared the intracellular accumulations of R6G and doxorubicin in three strains of *B. subtilis* previously described (24), either WT, invalidated for BmrA, or overexpressing BmrA (WT, KO, and BmrA+, respectively; Fig. 3D). While WT and KO strains display the same trends, the BmrA+ strain accumulates ~50% less each compound, therefore supporting the fact that R6G is a substrate of BmrA, which works as an exporter. Last, we also look at the stimulation of the ATPase activity of BmrA by the addition of substrates, but we could not detect any substantial effect of R6G, doxorubicin, or even Hoechst 33342 (fig. S12E), probably because of its high basal ATPase activity, as previously reported for this protein (23), and also for Cdr1 (37) and Pdr5 (28).

Two R6G molecules could be fitted in each density, although not in a perfect symmetrical position (Fig. 3A and fig. S7, C to F), explaining why the C2 symmetry does not improve those densities. R6G binds at the level of the outward leaflet, between TM1–2 of one monomer and TM5’–6’ of the other one. Each molecule is maintained in a hydrophobic cavity by a movement of TM1 toward TM2, mainly stabilized by van der Waals contacts with lateral chains

of residues T39, S43, I46, F75, A78, I254’, S255’, L258’, F291’, I294’, and M295’. Few polar groups contribute also to the binding site including the alcohol group of S81, S225’, and T302’ and the carbonyl groups of A78, G251’, and F291’ (Fig. 3B and fig. S7, E and F). Such organization of the R6G pockets is close to that previously found in AcrB, together with the conformation of the R6G molecules themselves (fig. S7G). Several of these residues correspond to those found in the taxol-binding pocket of human ABCB1 in IF conformation (fig. S13) (14).

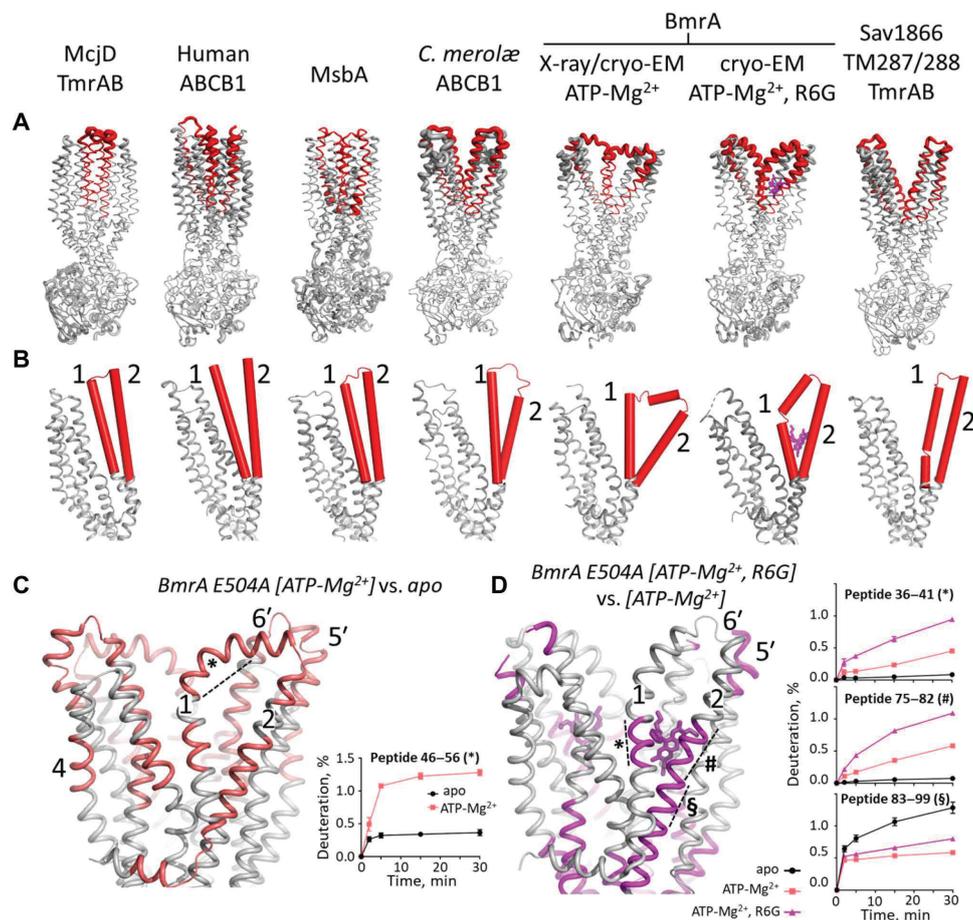
### Structural differences between the structures of BmrA with and without substrate highlight the mobility of the TM1–2 region

Although quite similar, these structures of BmrA display important local differences rendering the substrate-exit path substantially different between them (Fig. 2). The differences originate from a displacement of the TM1–2 region, in the proximity of a kink starting in TM1 at residue P47 toward the end of TM1. Such displacement allows the central part of TM1 to shift from TM3 in the x-ray/cryo-EM structure toward TM2 in the cryo-EM + R6G structure. These differences between structures solved under identical or nearly identical conditions highlight a major local plasticity at the level of TM1–2. To evaluate its structural relevance, we tentatively

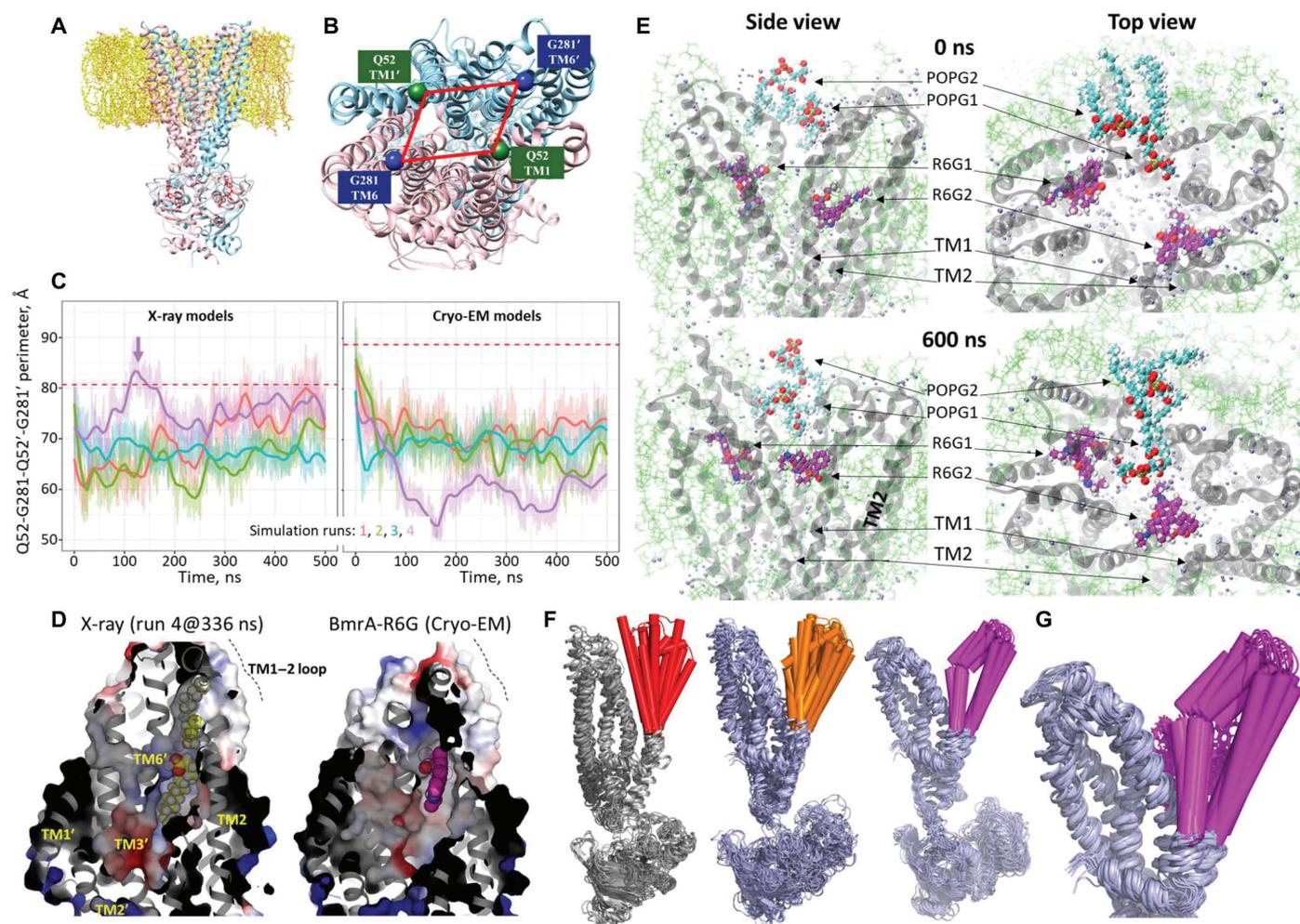
compared these structures with a panel of nucleotide-bound exporters of the same subtype IV: *Escherichia coli* McjD (8, 11), *Thermus thermophilus* TmrAB (13), human (4) and *C. merolae* (15) ABCB1, *E. coli* MsbA (16), *Staphylococcus aureus* Sav1866 (5), and *Thermotoga maritima* TM287/288 (38). Although the structural disparity of these different proteins, positioning them from the most occluded to the widest open (Fig. 4, A and B), suggested that TM1 in the x-ray and cryo-EM structures of BmrA without R6G may be oriented similarly as in McjD, ABCB1, and MsbA, conversely, TM2 may be shifted toward the OF conformation typically observed as in Sav1866. The loop connecting TM1 and TM2 has unwound on each side, allowing and/or accompanying the movement of TM2. In the cryo-EM structure with R6G, a consecutive displacement of TM1 shifting toward TM2 is seen, with an unwinding that takes place downward on TM1. The most open structures of Sav1866 and TM287/288 show TM1 and TM2 segments close together and separated from those forming the TM3–6 core. This

motion of TM1–2 is concomitant with a wide opening of the cavity and a physical separation of the two TM3–6 cores that behave as rigid bodies. The movement might be granted by the intrinsic flexibility of ABC transporters on their external side, as suggested by molecular dynamics simulations carried out with McjD (20) and hinted by the B factors displayed in Fig. 4A.

Aligning the TM1–2 regions of these transporters with respect to their topologically conserved regions encompassing TM3–6 core and NBD allows visualizing the various conformations adopted by TM1–2, suggesting a hand fan motion (Fig. 4B and shown and detailed in Fig. 5F). We therefore explored the level of accessibility of TM1–2 of BmrA E504A in detergent solution by HDX-MS experiments (Fig. 4, C and D). We first observed that the trapping of the OF conformation by adding ATP-Mg<sup>2+</sup> to the mutant increases the accessibility of the TM1–2 region (Fig. 4C). Several transmembrane peptides display a significantly higher deuterium uptake when adopting the OF conformation, notably those localized in the



**Fig. 4. Conformations and mobilities of TM1–2 in OF BmrA and other type IV ABC transporters.** (A) Views (PDB codes) of McjD (**4pl0**, 5ofr), TmrAB (left: **6rai**, 6rak; right: 6rah–6raj), human (**6c0v**) and *C. merolae* ABCB1 (**6a6m**), MsbA (**5ttp**), BmrA [this study, with ATP-Mg<sup>2+</sup> (x-ray: 6r72; cryo-EM: **7ow8**) and with ATP-Mg<sup>2+</sup> and R6G cryo-EM: **7bg4**], Sav1866 (**2hyd**), and TM287/288 (**6qv0**, 6qv1, 6qv2), superimposed from TM3 to TM6 and displayed from left to right from the most occluded to the widest open conformation. For clarity, only structures with bold PDB codes are displayed. Cartoon thickness is proportional to B factor. TM1–2 is colored in red. (B) Close-up view of TM1–6 of each monomer (and of the N-terminal half of ABCB1) with the TM1–2 segment in red cylinders. (C and D) HDX-MS experiments of BmrA E504A in DDM-cholate identifying the TM regions with increased deuterium accessibility in the OF state. (C) displays the ATP-Mg<sup>2+</sup>-bound state as compared to the apo state. (D) compares the ATP-Mg<sup>2+</sup>-bound state with and without R6G. Pictures display the accessible regions after 30-min exchange, colored in salmon ( $P < 0.01$ ) and magenta ( $P < 0.001$ ). Time-dependent deuteration plots of the indicated peptides are shown.



**Fig. 5. Dynamics of the BmrA TMD region.** (A) Starting model of BmrA in a lipid bilayer. Chains A and B are colored in pink and cyan, ATP in red, and lipids in yellow. (B) Close-up view showing residues chosen for measuring the perimeter of the cavity. (C) Time evolution of the cavity perimeter for each simulation. Red dashed lines indicate the initial values of the distances. The arrow indicates the time at which a POPG molecule inserts through TM1–2 in the fourth simulation. (D) Electrostatic maps of the BmrA, either from simulation 4 from the x-ray structure taken at 336 ns with the POPG binding to the substrate-binding pocket (left) and from the cryo-EM structure with R6G (right). (E) Snapshots of the molecular dynamics of BmrA E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>, R6G] at 0 and 600 ns. Additional snapshots at 300 and 900 ns are displayed in fig. S19A. POPG molecules coming into the cavity are in cyan. (F) Superimposition of the structures displayed in Fig. 3A with TM1–2 in red and comparison with the poses got by molecular dynamic simulations carried out without (orange) and with (magenta) R6G (R6G molecules have been omitted for clarity). (G) Close-up view of the poses with R6G.

TM1–2 region such as the peptides 46 to 56 (asterisk in Fig. 4C). Such trend is also observed in nanodiscs and comparable to the WT BmrA stabilized by Vi trapping (fig. S14). Note that as compared to the detergent environment, in nanodiscs, a smaller number of transmembrane peptides show an increased deuteration, but they still mostly localize to TM1, TM2, and TM6. We then observed that the addition of R6G to BmrA E504A in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup> significantly increases the accessibility to deuterium of the main chain of transmembrane parts surrounding the R6G-binding region, notably peptides 36 to 41 and 75 to 82 in TM1 and TM2, respectively, translating a structural rearrangement consistent with a wider opening of TM1–2 in the presence of R6G (Fig. 4D). Together, these results are consistent with the mechanical plasticity of TM1–2 inferred from the x-ray and cryo-EM structures of BmrA, which may be a key feature of MDR pumps allowing the release of substrates varying in size and shape.

### Molecular dynamics simulations of x-ray and cryo-EM structures of BmrA

To get a dynamic view of the substrate-exit site of BmrA, we performed two series of all-atom molecular dynamics simulations of BmrA in complex with ATP-Mg<sup>2+</sup> reconstituted in a lipid bilayer (Fig. 5A), either without or with R6G.

First, we investigated dynamics of BmrA in the absence of R6G. We carried out four simulations of 500 ns on each x-ray and cryo-EM (+R6G from which we removed it) structures under identical conditions using different starting velocities. We estimated the size of the substrate-exit cavity by measuring the variation with time of the perimeter formed by the C $\alpha$  of the two residues Q52 in TM1 and G281 in TM6 of each monomer (Fig. 5, B and C). As shown, the initial perimeter of the cryo-EM structure, up to 90 Å, was larger than that of the x-ray one, up to 80 Å. Considering the simulation settings and the limited resolution of the structures, we expected to

observe only changes driven by strong forces. All the models undergo a closure (Fig. 5C and fig. S15), reaching a common perimeter of  $\sim 70$  Å. BmrA shifts toward the most occluded states, as the one observed in MsbA and ABCB1 in Fig. 4 (A and B). This closure is rapid, generally occurring within the initial 100 ns, as also proposed for the extracellular gate of TmrAB (13). It contrasts with the stabilized wider open conformation of the x-ray and cryo-EM experiments, possibly because of the DDM-cholate mixture in which BmrA is maintained in these experiments contrarily to the simulations. This fast closure is followed by large-scale structural fluctuations (fig. S16). Of note, a closure was also obtained in simulations with longer equilibration steps. An unexpected result came from the fourth simulation generated from the x-ray structure, which, by contrast to the others, rapidly opens during the first 100 ns its substrate-exit cavity up to  $\sim 83$  Å (magenta trace in Fig. 5C, left). This movement enlarges enough the lateral opening between TM1 and TM2 to allow a POPG [2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol)] molecule to penetrate through it and move to the substrate-binding cavity (Fig. 5D, left) in one R6G-binding site (Fig. 5D, right). One aliphatic chain of the lipid lays in the hydrophobic pocket, while its polar head is oriented toward the center of the cavity, as R6G.

Then, we carried out three simulations starting with the cryo-EM structure with R6G for 1  $\mu$ s and using the same settings. We parameterized the R6G, starting from the molecule in the cryo-EM structure, and then optimized it in a membrane environment (R6G parameterization files rhodamine6G.itp and forcefieldR6G.itp; fig. S17). By contrast with the dynamics carried out above without R6G, in the present ones, BmrA remains open in the OF conformation, leading to a rather constant Q52-G281-Q52'-G281' perimeter, which ranges between 95 and 115 Å (fig. S18A). One R6G (R6G2 in run 1) among the six of the three simulations substantially moved within the binding pocket (fig. S18B), going to the center of the cavity in  $\sim 300$  ns and then coming back to its initial location (Fig. 5E and fig. S18C). The movement of this R6G is accompanied with more contacts with water (fig. S19A) and less with protein (fig. S19B), which is typical of a solvation step preceding the release. However, such release does not occur as, early in the simulations, two lipids invade the pocket above the R6G molecules, forming a cap preventing their release (POPG 1 and 2 in Fig. 5E and fig. S18C). Since it cannot be expelled through the center of the pocket, the R6G2 molecules go back to its original location near TM1-2 in  $\sim 400$  ns, through which it also cannot be expelled because of the presence of lipids blocking this access (Fig. 5E). A longer simulation time would be necessary to allow a release of the substrate.

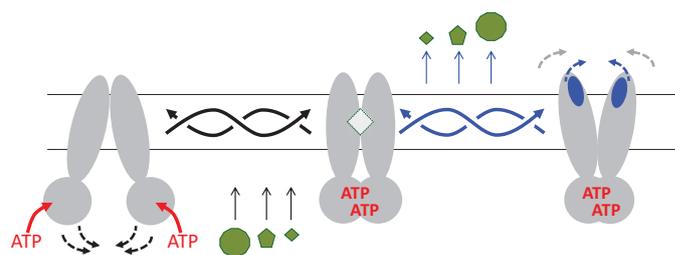
Last, we observed that the poses generated by the molecular dynamics of BmrA carried out in absence of R6G nicely reproduces the hand fan motion of TM1-2 introduced above as suggested by the superposition of the various type IV ABC structures displayed in Fig. 4A (Fig. 5F, left versus center). In presence of R6G, this hand fan movement is substantially reduced (Fig. 5F, right), with TM1-2 being stabilized by the substrate (Fig. 5G). Notably, for the half of the transporter where R6G moves away from the binding site, the transporter moves in concert accompanying R6G movement with plastic deformation of the binding site, highlighting adaptation of BmrA to its local substrate presence (fig. S19C).

## DISCUSSION

The BmrA structures presented here unravel new conformations in the landscape of structures of multidrug ABC transporters resolved

in OF conformations, and one of them reveals a structure of a type IV MDR ABC transporter with its transported substrate in a substrate-release competent state. The R6G molecules are located at the level of the outer leaflet and are poised to be released from the transporter. Several parameters have contributed to stabilize this ternary complex, among them the positive effect of R6G and ATP-Mg<sup>2+</sup> on their mutual affinities, together with the amphipathic nature of R6G added of a marked hydrophobicity. The present structures reveal a substrate-release site made of flexible (TM1-2) and rigid (TM3-6) regions. Combined with HDX-MS and molecular dynamics simulations, they provide new information on the mechanism of substrate release from the substrate-binding pocket and suggest how the transporter may reset to an occluded conformation by closing back on itself immediately after substrate release. The flexibility of multidrug ABC transporters has been well established in IF states, sampling different conformations that facilitate recognition of multiple compounds (35, 39, 40). The current study reveals that such a flexibility is also sampled in OF conformations, presumably with a lower amplitude. We propose that this flexibility is required to adapt the site to various substrates' sizes, essential to secure their release to the extracellular side, and also to reset the transporter back to an occluded state, thereby preventing any trans-inhibition mechanism as reported recently (41). Such flexibility is also consistent with the fast dynamics of the extracellular gate of TM287/288 observed in EPR experiments (42) and suggests that no additional energy input is needed for substrate release.

A key point arises when comparing the fast closure revealed by the simulations with the stabilized outward states observed in both x-ray and cryo-EM structures. A similar flexibility of the external part of the transmembrane segments is observed in the structures and simulations. In the case of experimental structures, the hydrophobic nature of the substrate-binding cavity, together with the accessibility to water, may favor its filling with amphipathic detergents and stabilize this conformation, as seen previously by molecular dynamic simulations carried out on the OF conformation of Sav1866 in the presence of DDM (33). The fact that detergents are poor membrane mimetics and that the structures are those of a biochemically



**Fig. 6. Model of mechanism of efflux.** **Left:** IF conformation of the transporter displaying flexibility at the NBD level, with different degrees of opening of the substrate-binding cavity (black dotted arrows) and allowing for diverse shapes and sizes of substrates. **Middle:** Occluded conformation. **Right:** OF substrate-release conformation. Release occurs via a plastic deformation of the external part of the transmembrane region. Deformation of the apex is adapted to the size or chemical property of the substrates (blue dotted arrows). Hydrophobicity of the substrate-binding pocket triggers the immediate closing of the external part of the transporter, which swings back to the occluded state. ATP hydrolysis occurs, followed by ADP and Pi release resulting in the opening in the IF conformation again, ready for another swing. Twisted arrows exemplify the different routes the transporter can take to reach any conformation, granted by the local deformability of the transmembrane helices.

stabilized version of BmrA (E504A) may have also contributed to stabilize this conformation. Although detergent molecules are too mobile and flexible to be observed at these resolutions, they do however constitute excellent tools to capture such transient states. In the case of simulations in lipid membrane, the hydrophobic pocket is exposed to water, which is extremely unfavorable and leads to a rapid motion of TM1–2 that closes the pocket to shield it from water. Molecular dynamics simulations carried out with McjD have predicted a marked flexibility of the TM1–2 region (20), later observed by single-molecule Förster resonance energy transfer (43), pointing to a possible role of this region in the release of substrates. This motion appears sufficient per se to reset the transporter back to an occluded conformation. The hydrophobicity of the substrate-binding pocket is so important that in one simulation, a lipid moved into the cavity (Fig. 5, C and D), causing the cavity to remain open. This result fits well with the presence of a detergent molecule in the binding pocket of McjD (8) together with the very recent discovery of a lipid inside the structure of the major facilitator superfamily protein LrmP (44).

Together, these data emphasize that independent of ATP hydrolysis, hydrophobicity of the substrate-binding pocket alone could promote pocket closure, following a mechanism that may be similar to the hydrophobic collapse described for ion-gated channels (45). The intrinsic flexibility of the IF and OF conformations, documented here and well characterized at the level of the NBDs and TMD (39, 43, 46, 47), together with this hydrophobic collapse, leads us to favor a mechanism of transport as depicted in Fig. 6. As schematized, the intrinsic flexibility of the exporter in the IF state first allows it to sample multiple conformations adjusting for chemically unrelated substrates. Binding of ATP then leads to the occluded conformation that transiently traps the substrate, and then followed by a plastic deformation of the outward-most part of the exporter (e.g., exemplified with the cartoon thickness proportional to the B factor in Fig. 4A). Again, this plasticity allows the exporter first to accommodate the chemical variability of the substrates and second to release them. The hydrophobic collapse of the substrate-binding pocket then triggers the closing of the transporter, without additional energy input [leading to the hypothesis that ATP hydrolysis occurs after substrate release, as already proposed (19, 38)], allowing the exporter to swing back toward the IF conformation, ready to take on a new molecule. Consequently, in this model, intrinsic plasticity and hydrophobicity collapse alleviate the need for precisely defined conformations at each stage of transport (symbolized by the twisted blue and black arrows in Fig. 6).

## MATERIALS AND METHODS

Materials and Methods are detailed in the Supplementary Materials and Methods. BmrA expression and purification were adapted from methods previously reported (23, 48). Thermostabilization assays were carried out as previously reported (34). DDM and cholate quantifications were done as described in (33) and (49), respectively. The ATPase activity of BmrA was measured as previously described (34). The MSP1E3D1 protein was expressed and purified and reconstituted with lipids and BmrA as previously described (36). Ligand binding, transport, accumulation, and HDX experiments are detailed in the Supplementary Materials and Methods. BmrA crystallization and additive syntheses, cryo-EM assays, and in silico simulations are detailed in the Supplementary Materials and Methods.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abg9215>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

## REFERENCES AND NOTES

1. O. Jardetzky, Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* **211**, 969–970 (1966).
2. K. Linton, C. Higgins, Structure and function of ABC transporters: The ATP switch provides flexible control. *Pflügers Arch.* **453**, 555–567 (2007).
3. K. P. Locher, Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 487–493 (2016).
4. Y. Kim, J. Chen, Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science* **359**, 915–919 (2018).
5. R. J. Dawson, K. P. Locher, Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180–185 (2006).
6. A. Ward, C. L. Reyes, J. Yu, C. B. Roth, G. Chang, Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19005–19010 (2007).
7. A. B. Ward, P. Szcwyczyk, V. Grimard, C. W. Lee, L. Martinez, R. Doshi, A. Caya, M. Villaluz, E. Pardon, C. Cregger, D. J. Swartz, P. G. Falson, I. L. Urbatsch, C. Govaerts, J. Steyaert, G. Chang, Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 13386–13391 (2013).
8. H. G. Choudhury, Z. Tong, I. Mathavan, Y. Li, S. Iwata, S. Zirah, S. Rebuffat, H. W. van Veen, K. Beis, Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 9145–9150 (2014).
9. A. Bles, D. Janulien, T. Hofmann, N. Koller, C. Schmidt, S. Trowitzsch, A. Moeller, R. Tampé, Structure of the human MHC-1 peptide-loading complex. *Nature* **551**, 525–528 (2017).
10. Z. L. Johnson, J. Chen, Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1. *Cell* **168**, 1075–1085.e9 (2017).
11. K. Bountra, G. Hagelueken, H. G. Choudhury, V. Corradi, K. el Omari, A. Wagner, I. Mathavan, S. Zirah, W. Yuan Wahlgren, D. P. Tieleman, O. Schiemann, S. Rebuffat, K. Beis, Structural basis for antibacterial peptide self-immunity by the bacterial ABC transporter McjD. *EMBO J.* **36**, 3062–3079 (2017).
12. H. Göddeke, M. H. Timachi, C. A. J. Hutter, L. Galazzo, M. A. Seeger, M. Karttunen, E. Bordignon, L. V. Schäfer, Atomistic mechanism of large-scale conformational transition in a heterodimeric ABC exporter. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 4543–4551 (2018).
13. S. Hofmann, D. Janulien, A. R. Mehdipour, C. Thomas, E. Stefan, S. Brüchert, B. T. Kuhn, E. R. Geertsma, G. Hummer, R. Tampé, A. Moeller, Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions. *Nature* **571**, 580–583 (2019).
14. A. Alam, J. Kowal, E. Broude, I. Roninson, K. P. Locher, Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science* **363**, 753–756 (2019).
15. A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Matsuoka, Y. Kimura, K. Ueda, H. Kato, Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABC1. *Nat. Commun.* **10**, 88 (2019).
16. W. Mi, Y. Li, S. H. Yoon, R. K. Ernst, T. Walz, M. Liao, Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature* **549**, 233–237 (2017).
17. O. Lewinson, C. Orelle, M. A. Seeger, Structures of ABC transporters: Handle with care. *FEBS Lett.* **594**, 3799–3814 (2020).
18. R. L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–162 (1976).
19. Z. L. Johnson, J. Chen, ATP binding enables substrate release from multidrug resistance protein 1. *Cell* **172**, 81–89.e10 (2018).
20. R. X. Gu, V. Corradi, G. Singh, H. G. Choudhury, K. Beis, D. P. Tieleman, Conformational changes of the antibacterial peptide ATP binding cassette transporter McjD revealed by molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **54**, 5989–5998 (2015).
21. C. Thomas, R. Tampé, Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annu. Rev. Biochem.* **89**, 605–636 (2020).
22. C. Thomas, S. G. Aller, K. Beis, E. P. Carpenter, G. Chang, L. Chen, E. Dassa, M. Dean, F. Duong van Hoa, D. Ekiert, R. Ford, R. Gaudet, X. Gong, I. B. Holland, Y. Huang, D. K. Kahne, H. Kato, V. Koronakis, C. M. Koth, Y. Lee, O. Lewinson, R. Lill, E. Martinoia, S. Murakami, H. W. Pinkett, B. Poolman, D. Rosenbaum, B. Sarkadi, L. Schmitt, E. Schneider, Y. Shi, S. L. Shyng, D. J. Slotboom, E. Tajkhorshid, D. P. Tieleman, K. Ueda, A. Váradi, P. C. Wen, N. Yan, P. Zhang, H. Zheng, J. Zimmer, R. Tampé, Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters. *FEBS Lett.* **594**, 3767–3775 (2020).
23. E. Steinfelds, C. Orelle, J. R. Fantino, O. Dalmás, J. L. Rigaud, F. Denizot, A. di Pietro, J. M. Jault, Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **43**, 7491–7502 (2004).
24. H. Krügel, A. Licht, G. Biedermann, A. Petzold, J. Lassak, Y. Hupfer, B. Schlott, C. Hertweck, M. Platzer, S. Brantl, H. P. Saluz, Cervimycin C resistance in *Bacillus subtilis* is due to a promoter up-mutation and increased mRNA stability of the constitutive ABC-transporter gene *bmrA*. *FEMS Microbiol. Lett.* **313**, 155–163 (2010).

25. C. Orelle, O. Dalmás, P. Gros, A. Di Pietro, J. M. Jault, The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* **278**, 47002–47008 (2003).
26. H. W. van Veen, K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. Driessen, W. N. Konings, Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10668–10672 (1996).
27. S. Nim, L. G. Lobato, A. Moreno, V. Chaptal, M. K. Rawal, P. Falson, R. Prasad, Atomic modelling and systematic mutagenesis identify residues in multiple drug binding sites that are essential for drug resistance in the major *Candida* transporter Cdr1. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 2858–2870 (2016).
28. R. Ernst, P. Kueppers, C. M. Klein, T. Schwarzmueller, K. Kuchler, L. Schmitt, A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5069–5074 (2008).
29. M. Ahmed, L. Lyass, P. N. Markham, S. S. Taylor, N. Vázquez-Laslop, A. A. Neyfakh, Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* **177**, 3904–3910 (1995).
30. H. Sjuts, A. V. Vargiu, S. M. Kwasny, S. T. Nguyen, H. S. Kim, X. Ding, A. R. Ornik, P. Ruggerone, T. L. Bowlin, H. Nikaido, K. M. Pos, T. J. Opperman, Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 3509–3514 (2016).
31. C. Orelle, F. Gubellini, A. Durand, S. Marco, D. Lévy, P. Gros, A. di Pietro, J. M. Jault, Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA. *Biochemistry* **47**, 2404–2412 (2008).
32. S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**, 1718–1722 (2009).
33. V. Chaptal, F. Delolme, A. Kilburg, S. Magnard, C. Montigny, M. Picard, C. Prier, L. Monticelli, O. Bornert, M. Agez, S. Ravaut, C. Orelle, R. Wagner, A. Jawhari, I. Broutin, E. Pebay-Peyroula, J. M. Jault, H. R. Kaback, M. le Maire, P. Falson, Quantification of detergents complexed with membrane proteins. *Sci. Rep.* **7**, 41751 (2017).
34. K. A. Nguyen, M. Peuchmaur, S. Magnard, R. Haudecoeur, C. Boyère, S. Mounien, I. Benammar, V. Zampieri, S. Igonet, V. Chaptal, A. Jawhari, A. Boumendjel, P. Falson, Glycosyl-substituted dicarboxylates as detergents for the extraction, overstabilization, and crystallization of membrane proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 2948–2952 (2018).
35. D. Lacabanne, C. Orelle, L. Lecoq, B. Kunert, C. Chuilon, T. Wiegand, S. Ravaut, J. M. Jault, B. H. Meier, A. Böckmann, Flexible-to-rigid transition is central for substrate transport in the ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis*. *Commun. Biol.* **2**, 149 (2019).
36. F. J. Alvarez, C. Orelle, A. L. Davidson, Functional reconstitution of an ABC transporter in nanodiscs for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9513–9515 (2010).
37. S. Shukla, V. Rai, D. Banerjee, R. Prasad, Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: Purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis. *Biochemistry* **45**, 2425–2435 (2006).
38. C. A. J. Hutter, M. H. Timachi, L. M. Hürlimann, I. Zimmermann, P. Egloff, H. Göddeke, S. Kucher, S. Štefanić, M. Karttunen, L. V. Schäfer, E. Bordignon, M. A. Seeger, The extracellular gate shapes the energy profile of an ABC exporter. *Nat. Commun.* **10**, 2260 (2019).
39. S. Mehmood, C. Domene, E. Forest, J. M. Jault, Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 10832–10836 (2012).
40. P. C. Wen, B. Verhalen, S. Wilkens, H. S. McHaourab, E. Tajkhorshid, On the origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state. *J. Biol. Chem.* **288**, 19211–19220 (2013).
41. K. Barth, S. Hank, P. E. Spindler, T. F. Prisner, R. Tampé, B. Joseph, Conformational coupling and trans-inhibition in the human antigen transporter ortholog TmrAB resolved with dipolar EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 4527–4533 (2018).
42. M. H. Timachi, C. A. J. Hutter, M. Hohl, T. Assafa, S. Böhm, A. Mittal, M. A. Seeger, E. Bordignon, Exploring conformational equilibria of a heterodimeric ABC transporter. *eLife* **6**, e20236 (2017).
43. F. Husada, K. Bountra, K. Tassis, M. Boer, M. Romano, S. Rebuffat, K. Beis, T. Cordes, Conformational dynamics of the ABC transporter McjD seen by single-molecule FRET. *EMBO J.* **37**, e100056 (2018).
44. V. Debruycker, A. Hutchin, M. Masureel, E. Fici, C. Martens, P. Legrand, R. A. Stein, H. S. Mchaourab, J. D. Faraldo-Gómez, H. Remaut, C. Govaerts, An embedded lipid in the multidrug transporter LmrP suggests a mechanism for polyspecificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 829–835 (2020).
45. M. O. Jensen, D. W. Borhani, K. Lindorff-Larsen, P. Maragakis, V. Jogini, M. P. Eastwood, R. O. Dror, D. E. Shaw, Principles of conduction and hydrophobic gating in K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 5833–5838 (2010).
46. P. P. Borbat, K. Surendhran, M. Bortolus, P. Zou, J. H. Freed, H. S. Mchaourab, Conformational motion of the ABC transporter MsbA induced by ATP hydrolysis. *PLoS Biol.* **5**, e271 (2007).
47. M. Yang, N. Livnat Levanon, B. Acar, B. Aykac Fas, G. Masrati, J. Rose, N. Ben-Tal, T. Hailloglu, Y. Zhao, O. Lewinson, Single-molecule probing of the conformational homogeneity of the ABC transporter BtuCD. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 715–722 (2018).
48. B. Wiseman, A. Kilburg, V. Chaptal, G. C. Reyes-Mejia, J. Sarwan, P. Falson, J. M. Jault, Stubborn contaminants: Influence of detergents on the purity of the multidrug ABC transporter BmrA. *PLOS ONE* **9**, e114864 (2014).
49. E. Heftmann, S. T. Ko, R. D. Bennett, Response of steroids to sulfuric acid in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **21**, 490–494 (1966).
50. C. M. Hebling, C. R. Morgan, D. W. Stafford, J. W. Jorgenson, K. D. Rand, J. R. Engen, Conformational analysis of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs by hydrogen exchange mass spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 5415–5419 (2010).
51. A. M. Lau, J. Claesen, K. Hansen, A. Politis, Deuterio 2.0: Peptide-level significance testing of data from hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. *Bioinformatics* **37**, 270–272 (2021).
52. Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D. J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Pérez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, Ş. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A. F. Jarnuczak, T. Ternent, A. Brazma, J. A. Vizcaino, The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450 (2019).
53. J. Y. Lee, J. G. Yang, D. Zhitsnitsky, O. Lewinson, D. C. Rees, Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science* **343**, 1133–1136 (2014).
54. L. Zimmermann, A. Stephens, S. Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. N. Lupas, V. Alva, A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* **430**, 2237–2243 (2018).
55. M. A. Lomize, I. D. Pogozheva, H. Joo, H. I. Mosberg, A. L. Lomize, OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40**, D370–D376 (2012).
56. J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V. S. Pande, D. A. Case, C. L. Brooks III, A. D. MacKerell Jr., J. B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 405–413 (2016).
57. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447 (2008).
58. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593 (1995).
59. S. Páll, B. Hess, A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures. *Comput. Phys. Commun.* **184**, 2641–2650 (2013).
60. G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101 (2007).
61. M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
62. K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, Mackerell AD Jr, CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* **31**, 671–690 (2010).

**Acknowledgments:** We thank K. Martin Pos for the gift of the CD43(DE3) $\Delta$ AcrB *E. coli* strain and H. Krügel for those of *B. subtilis* 168 and 8R. We thank L. Martinez for input in the BrmA purification process in introducing the cholate-DDM mixture. We thank the Synchrotron SOLEIL and ESRF staff, the crystallography platform from SFR Bioscience UMS 3444, and IBCP. We thank C. Von Rhein and P. Legrand for the help in anisotropic data processing. Cryo-EM sample screening, optimization, and data collection were performed at the Cryo-EM Swedish National Facility in Stockholm, Sweden, funded by the Knut and Alice Wallenberg, Family Erling Persson and Kempe Foundations, ScilifeLab, Stockholm University, and the Umeå University. B.W. thanks M. Carroni and J. Conrad from the Swedish National Facility in Stockholm for the technical assistance in cryo-EM data collection. We thank the staff of beamline CM01 at ESRF for rapid access data collection through the proposal MX2344. We also thank the reviewers for the constructive inputs that contributed to substantial improvement of the manuscript. Last but not least, P.F. thanks G. Deleage for the constant support along these years, particularly at the beginning of the study. **Funding:** This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Lyon University, the Grenoble-Alpes University, the French Research Agency (ANR), and Auvergne-Rhône-Alpes region (ARC1) as follows: ARC1-CLAMP grant no. 13 009802 01 to A.B., V.C., and P.F.; ANR-CLAMP-13-BSV5-0001-01 to P.F., A.B., V.C., and A.K.; ANR-NMX-14-CE09-0024-03 to P.F., J.-M.J., and V.C.; ANR-CAVEOTANK-17-CE11-0015-03 to P.F. and V.C.; ANR-CLAMP2-18-CE11-0002-01 to P.F., A.B., M.H., and V.C.; ANR-17-EURE-0003 (CBH-EUR-GS) to A.B. and M.P.; and ANR-19-CE11-0023-01 to C.O., V.C., J.-M.J., and P.F. Molecular dynamics calculations were carried out at CINES, GENCI grant no.

A0040710138 to L.M. Financial support was also provided to M.H. by the Swedish Research Council (2017-04018) and the Knut and Alice Wallenberg Foundation (2017.0275). A.K. and V.Z. PhDs were funded by ARC1 and EDISS school, respectively. K.-A.N.'s PhD was funded by EDCSV of Grenoble-Alpes University. B.W.'s postdoc was funded by the ANR projects CAVEOTANK and CLAMP2. J.E. was funded by the ANR CLAMP2. The HDX-MS experiments were supported by the French Ministry of Research (Investissements d'Avenir Program, Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08), the Fonds Européens de Développement Régional Toulouse Métropole, and the Région Midi-Pyrénées. The cryo-EM data for resolving the apo-BmrA structure were collected using the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). The electron microscope facility is supported by the Auvergne-Rhône-Alpes Region, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER, and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA). **Author contributions:** V.C., V.Z., A.K., A.G., and S.M. purified BmrA and carried out the crystallography experiments. M.H. granted access to cryo-EM equipment, and B.W. carried out the cryo-EM experiments for the R6G-BmrA complex. G.S., A.G., and V.C. carried out the cryo-EM experiments with the apo form using the Grenoble Instruct-ERIC platform. V.Z., V.C., and P.F. carried out the detergent quantifications. V.C., V.Z., A.G., and B.W. resolved the structures. C.O. and V.Z. prepared the E504A mutant. V.Z., C.O., S.M., and A.G. carried out the ATPase assays. A.B. and P.F. conceived the crystallization additives, and K.-A.N., M.P., and A.B. synthesized them. S.M. and P.F. carried out the thermostability assays. J.Mart., J.E., and L.M. carried out the dynamic simulations. W.J., M.D.C., and J.Marc. performed the HDX-MS experiments supervised by J.-M.J. and C.O. J.-M.J.

and C.O. contributed to the analysis of the results. V.Z., A.G., M.D.C., S.M., C.O., J.-M.J., V.C., and P.F. carried out the biochemical experiments. P.F. managed the overall project. The manuscript was written through contributions of all the authors who gave their approval to its final version. **Competing interests:** P.F., J.D., A.B., M.P., K.-A.N., and S.M. are inventors on a patent related to this work filed by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Claude Bernard-Lyon 1 University and the Grenoble-Alpes University (nos. FR3063730B1, US20210130385A1, and WO2018162806A1), filed 9 March 2017, published 13 September 2018 (WO2018162806A1), 6 May 2021 (US20210130385A1), and 17 September 2021 (FR3063730B1). Crystallization additive requests can be addressed for research only to pierre.falson@univ-lyon1.fr or to ahcene.boumendjel@univ-grenoble-alpes.fr. The other authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** Crystal and cryo-EM structures of BmrA-E504A [ATP-Mg<sup>2+</sup>] have been deposited in the Protein Data Bank and Electron Microscopy Data Bank with the following codes: x-ray: PDB 6r72; cryo-EM (with R6G unresolved): PDB 6r81, EMDB 4749 (C2 symmetry); cryo-EM (with R6G resolved): PDB 7BG4, EMDB 12170 (no symmetry); cryo-EM (without R6G): PDB 7ow8, EMDB-13095. The HDX-MS data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD027447. Simulations are available online on Zenodo, with the DOI 10.5281/zenodo.5543740. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Submitted 4 February 2021  
Accepted 30 November 2021  
Published 26 January 2022  
10.1126/sciadv.abg9215

## Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter

Vincent ChaptalVeronica ZampieriBenjamin WisemanCédric OrelleJuliette MartinKim-Anh NguyenAlexia GobetMargot Di CesareSandrine MagnardWaqas JavedJad EidArnaud KilburgMarine PeuchmaurJulien MarcouxLuca MonticelliMartin HogbomGuy SchoehnJean-Michel JaultAhcène BoumendjelPierre Falson

*Sci. Adv.*, 8 (4), eabg9215. • DOI: 10.1126/sciadv.abg9215

### View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abg9215>

### Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of think article is subject to the [Terms of service](#)

---

*Science Advances* (ISSN ) is published by the American Association for the Advancement of Science. 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS. Copyright © 2022 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).

La publication précédente a montré que la flexibilité de la protéine était essentielle à la fonctionnalité de BmrA. Afin d'apporter des connaissances supplémentaires quant à sa dynamique structurale et sa capacité à prendre en charge différents substrats, j'ai étudié le passage de la conformation IF vers OF. Pour cela, j'ai résolu la structure cryo-EM de plusieurs intermédiaires conformationnels et je me suis intéressée en particulier au passage du comportement michaélien à allostérique vis-à-vis de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> en réponse à la fixation du substrat transporté, ici la R6G. Cette étude a été réalisée avec le mutant inactif BmrA-E504A, qui présente l'avantage d'opérer les mêmes changements conformationnels des formes IF vers OF que la version naturelle mais sans possibilité de retour à l'état IF. En outre, cette unidirectionnalité simplifie l'analyse des données de cryo-EM.

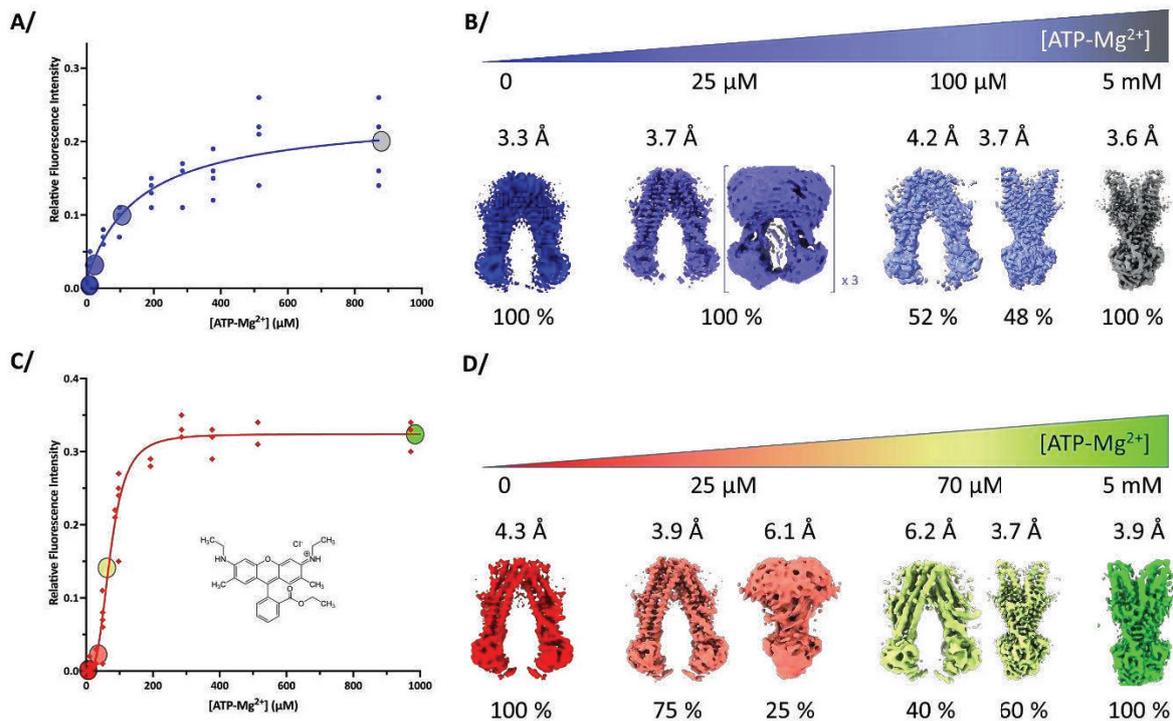
## II. Résultats :

### a. Passage d'un comportement michaélien à allostérique en réponse à la fixation d'un substrat

La fixation du nucléotide sur le mutant inactif de BmrA en absence de R6G s'effectue selon une saturation typique d'un comportement michaélien, ce qui est attendu, les deux sites de fixation d'ATP étant identiques (Figure 39A). Dans ces conditions, l'ATP-Mg<sup>2+</sup> se fixe sur la protéine avec une affinité de 150  $\mu$ M. En revanche, lorsque la R6G est préalablement fixée sur BmrA, la courbe de saturation devient sigmoïdale, témoignant d'un comportement allostérique (Figure 39C). L'affinité du nucléotide pour la protéine est alors de 70  $\mu$ M, avec un coefficient de Hill de 3,4. Cela reflète un changement rapide de BmrA d'une conformation à l'autre sur une gamme de concentration d'ATP très réduite. Le changement de fluorescence étant le reflet de la transition IF vers OF de BmrA, le changement s'opère entre 20 et 200  $\mu$ M d'ATP-Mg<sup>2+</sup> en présence de R6G alors qu'en son absence il est plus progressif et n'atteint la fluorescence maximale qu'au-delà d'un millimolaire. Afin d'avoir une vision structurale de ces différences de comportement, j'ai résolu plusieurs structures obtenues en absence ou en présence d'une concentration fixe de R6G (100  $\mu$ M) et de concentrations variables d'ATP-Mg<sup>2+</sup>. Les différents complexes produits sont nommés comme suit :

- en absence d'ATP-Mg<sup>2+</sup>: E504A<sup>Apo</sup> et E504A<sup>R6G</sup>,
- avec ATP-Mg<sup>2+</sup> en concentration équimoléculaire avec BmrA (ici 25  $\mu$ M, considérant le dimère) : E504A<sup>25 $\mu$ MATP</sup> et E504A<sup>R6G-25 $\mu$ MATP</sup>,
- avec ATP-Mg<sup>2+</sup> à une concentration proche du K<sub>D</sub> ou K<sub>0,5</sub>, 100 ou 70  $\mu$ M en fonction de l'absence ou la présence de R6G : E504A<sup>100 $\mu$ MATP</sup> et E504A<sup>R6G-70 $\mu$ MATP</sup>,
- avec une concentration saturante d'ATP-Mg<sup>2+</sup> : E504A<sup>5mMATP</sup> et E504A<sup>R6G-5mMATP</sup>

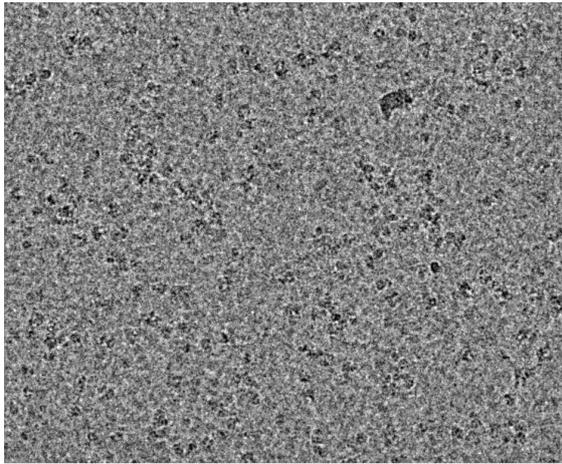
Ces concentrations données d'ATP (« ATP » est maintenant utilisé pour représenter l'entité « ATP-Mg<sup>2+</sup>») sont repérées par des cercles dans la Figure 39A,C, dont le code couleur est conservé dans la suite des résultats.



**Figure 39 : Fixation d'ATP-Mg<sup>2+</sup> sur BmrAE04A en présence ou absence de rhodamine 6G**  
 A/ Fixation michaelienne d'ATP-Mg<sup>2+</sup> en absence de R6G. Les cartes de densité électronique correspondantes sont sur le panneau B/ représentées avec la couleur associée.  
 C/ Fixation allostérique d'ATP-Mg<sup>2+</sup> en présence de 100 μM de R6G. Les cartes correspondantes sont représentées sur le panneau D/.  
 Chaque cercle de couleur correspond à une condition dont la structure a été résolue. Les concentrations d'ATP-Mg<sup>2+</sup> utilisées sont mentionnées sur l'échelle située au-dessus. Pour chaque condition, le pourcentage correspond à la proportion de particules retrouvées dans la conformation IF ou OF comme indiqué dans la figure. La résolution globale du jeu à FSC=0,143 est indiquée.

Avant d'en venir aux structures obtenues, je vais tout d'abord détailler le protocole d'obtention des lots de particules qui a permis d'en estimer les populations ainsi que leur analyse. Tout d'abord, le nombre de particules comptées sur les grilles a été obtenu en procédant à une recherche des particules par « blob » (*blob picker*), sans réduire le bruit de fond afin de maximaliser la quantité de particules. Cela a produit une population de plusieurs millions de particules sur l'ensemble des films (« movies »). Le bruit de fond a ensuite été atténué par une série de classifications 2D obtenues en appliquant une stringence progressive sur la sélection d'objets, la classification finale conservant une proportion de classes d'objets moins clairement identifiés pour ne pas exclure une partie potentiellement utilisable. Un micrographie et une classification 2D réalisées sont illustrés en Figure 40.

A/



B/

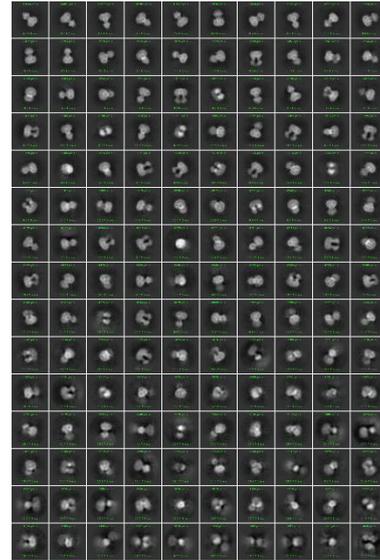


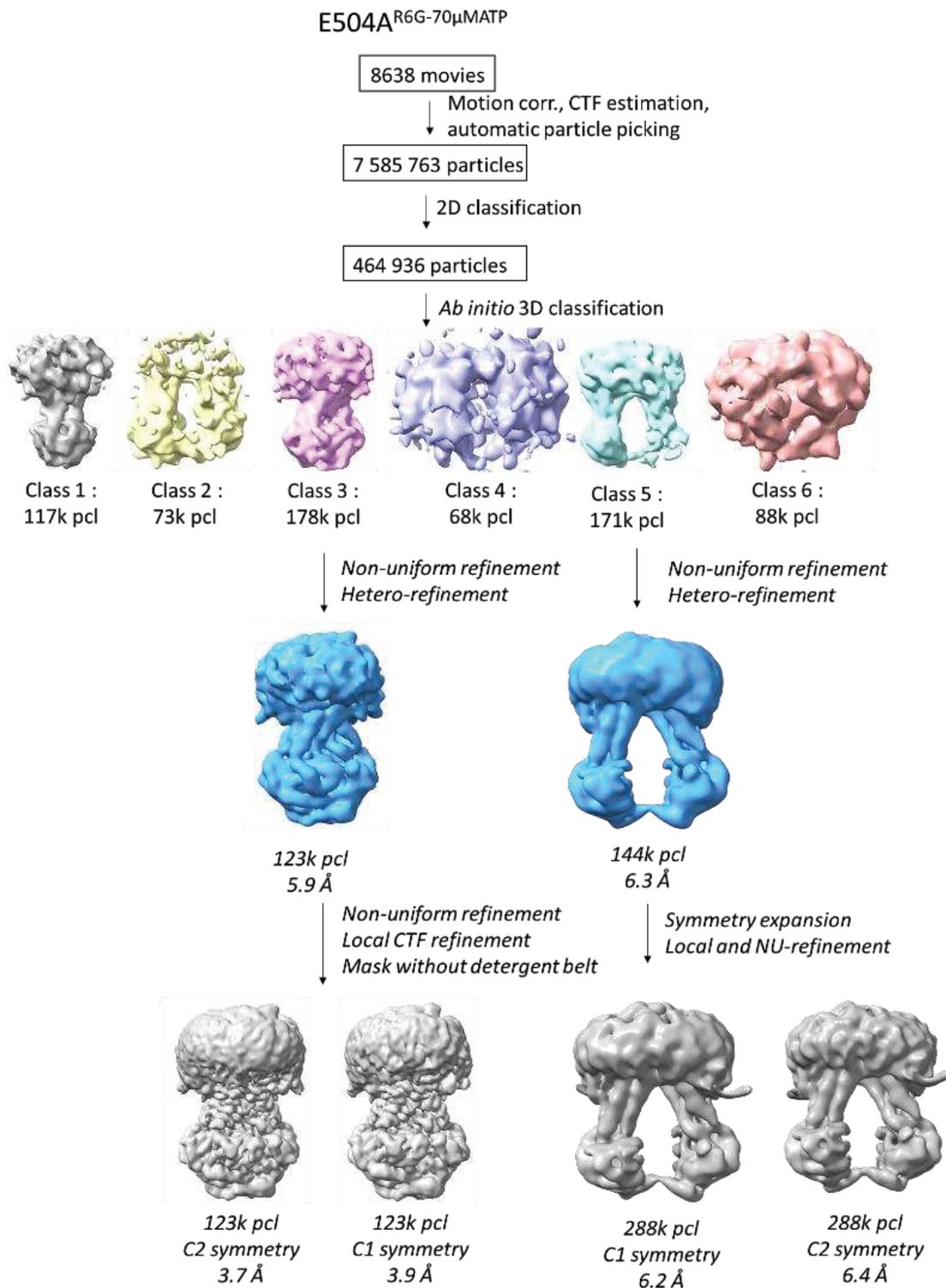
Figure 40 : Micrographe et classes 2D

A/ Micrographe pour le jeu de données E504A<sup>R6G-70 $\mu$ MATP</sup>.

B/ Classes 2D associées.

Les modèles 3D *ab initio* des différentes conditions expérimentales ont été générés à partir des particules sélectionnées, dans lesquelles les formes IF et OF de BmrA sont identifiables ainsi qu'1 ou 2 classes 3D inutilisables. Un enchainement d'affinements non-uniformes, hétérogènes et locaux permet enfin d'obtenir la reconstruction 3D finale. Dans certains cas, l'utilisation d'un masque a été nécessaire, notamment pour éliminer la contribution du détergent ou encore celle d'un domaine, typiquement un NBD, dans l'alignement pour mieux affiner la partie restante. La Figure 41 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** détaille le processus d'obtention de la reconstruction 3D d'une des conditions expérimentales.

L'ensemble des données collectées est reporté dans le tableau en Figure 42.



*Figure 41 : Traitement des données typique d'une collecte de BmrA*

Pour chaque modèle *ab initio*, diverses stratégies ont été employées, comme l'affinement individuel du jeu de particules ou bien la mise en commun des plusieurs jeux.

Typiquement, pour cet affinement, les classes 1 et 3 (gris et rose) sont toutes les deux en conformations OF mais la mise en commun de leurs particules ne donne pas de meilleure reconstruction que la classe 3 seule (montrée sur le schéma). C'est donc elle seule qui a donné la reconstruction présentée et permis d'obtenir le modèle correspondant.

	E504A <sup>R6G-25μMATP</sup> IF	E504A <sup>R6G-70μMATP</sup> OF	E504A <sup>R6G</sup>	E504A <sup>Apo</sup>	E504A <sup>25μMATP</sup>	E504A <sup>100μMATP</sup> OF	E504A <sup>100μMATP</sup> IF
[ATP-Mg] (μM)	25	70	0	0	25	100	100
[R6G] (μM)	100 μM	100 μM	100 μM	0	0	0	0
<b>Data collection and processing</b>							
Magnification	130000	130000	130000	105000	130000	130000	130000
Voltage (kV)	300	300	300	300	300	200	200
Electron exposure (e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> )	38.8	37.95	40.4	40.12	40.12	43	43
Defocus range (μm)		-1 to -2.4					
Pixel size (Å)	1.052	1.052	1.06	0.839	0.839	1.145	1.145
Symmetry imposed	C2	C2	C1	C2	C2	C1	
Initial particle images (no.) (from <i>ab-initio</i> job)	625 434	177 898	444 348	1 005 174	525 711	189 344	209 208
Final particle images (no.)	150,715	123,402	337937 Symmetry expansion : 675874	839,516	525,711	189,344 Symmetry expansion : 378,688	418,416
Map resolution (Å)	3.9	3.7	4.3	3.3	3.7	3,6	4.4
FSC threshold	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143
<b>Refinement</b>							
Initial model used (PDB code)	6R81	6R72	E504A <sup>R6G-25μMATP</sup> IF	E504A <sup>R6G-70μMATP</sup> IF	E504A <sup>R6G-25μMATP</sup> IF	7OW8	E504A <sup>25μMATP</sup>
Model resolution (Å)	4.2	4.2	4.3	7.7	4.3	3.7	6.9
FSC threshold	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0,5	0.5
Map sharpening <i>B</i> factors (Å <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	185.9	181.8	259.9	194.6	230.3	174,5	283.3
Model composition							
Non-hydrogen atoms	8868	9031	8868	8802	8802	8970	8786
Protein residues	1144	1156	1144	1144	1144	1140	1142
Ligands	2	6	2	0	0	6	0
<i>B</i> factors (Å <sup>2</sup> )							
Protein	143.91	71.09	141.8	49.86	133.26	109.5	189.64
Ligand	127.01	71.45	138.69			113.75	
R.m.s. deviations							
Bond lengths (Å)	0.005	0.008	0.009	0.017	0.015	0.012	0.007
Bond angles (°)	0.971	1.351	1.296	3.397	3.151	1.589	2.020
Validation							
MolProbity score	2.24	2.34	2.07	3.44	3.11	2.55	2.53
Clashscore	16.32	30.63	13.89	79.15	61.13	43.69	29.58
Poor rotamers (%)	0.52	0.72	0.00	3.53	2.39	0.42	0.31
Ramachandran plot							
Favored (%)	90.96	94.62	93.6	85.18	89.39	93.4	89.10
Allowed (%)	8.60	4.6	6.4	13.86	10.09	6.34	1019
Disallowed (%)	0.44	0.78	0	0.96	0.53	0.26	0.70

Figure 42 : Tableau des données de structures

Pour revenir à l'analyse des reconstructions et la répartition des particules présentée en Figure 39, on observe que pour la forme apo et celle complexée à la R6G, BmrA est 100% IF en absence d'ATP (conditions bleue et rouge « 0 ») et 100% OF en présence d'une concentration saturante d'ATP (condition grise et verte « 5 mM ATP »). Ceci est en accord avec les analyses biochimiques obtenues par fluorescence et en lien avec des données obtenues précédemment par mesure de diffusion des neutrons aux petits angles sur ces 2 conformations (Javed et al. 2022).

Une différence notable apparaît lorsque l'ATP est ajouté en concentration équimolaire à BmrA. En absence de R6G (condition bleue « 25  $\mu$ M ATP »), le processus aboutit à la conformation IF, dans des états distincts, dont un à haute résolution et trois autres à faible résolution. Ceci reflète un niveau de flexibilité croissant de la protéine qui suggère qu'une partie de la population de BmrA n'a pas interagit avec l'ATP (la plus statique, qui produit la meilleure résolution) contrairement aux autres qui initient cette interaction (les plus dynamiques, et moins résolues). En revanche, la présence de R6G (condition saumon « 25  $\mu$ M » ATP), révèle deux conformations, 75% IF à la meilleure résolution et 25% OF avec une résolution plus faible. Comme précédemment, on peut corrélérer cette différence de résolution à une différence de réactivité de BmrA vis-à-vis de l'ATP, mais cette fois avec un basculement plus net d'une conformation vers l'autre.

Aux concentrations d'ATP, cette fois proches du  $K_D$  (condition bleue « 100  $\mu$ M ATP ») ou du  $K_{0,5}$  (condition jaune « 70  $\mu$ M ATP » avec 100  $\mu$ M R6G), les deux conformations IF et OF coexistent en proportion équivalentes ou quasi-équivalentes. Toutefois, en présence de R6G, les particules en OF prédominent pour une concentration d'ATP plus faible par rapport à la forme sans R6G. Ceci est en lien avec le comportement allostérique qui permet un changement de population plus rapide sur une gamme de concentration d'ATP réduite.

Sur le plan structural, les formes IF que j'ai résolues n'ont pas d'ATP fixé tandis qu'elles ont 2 R6G liées quand cette dernière est présente, dans un site similaire à celui initialement observé en OF (Chaptal et al. 2022). Les positions de la R6G sont légèrement variables d'une structure à l'autre, en lien avec l'hydrophobicité du site qui permet de la flexibilité, et se traduit par des densités moins bien définies que pour l'ATP, par exemple en conformation OF. Par ailleurs, ces densités ne sont pas présentes dans les cartes qui n'ont pas de R6G (Figure 43).

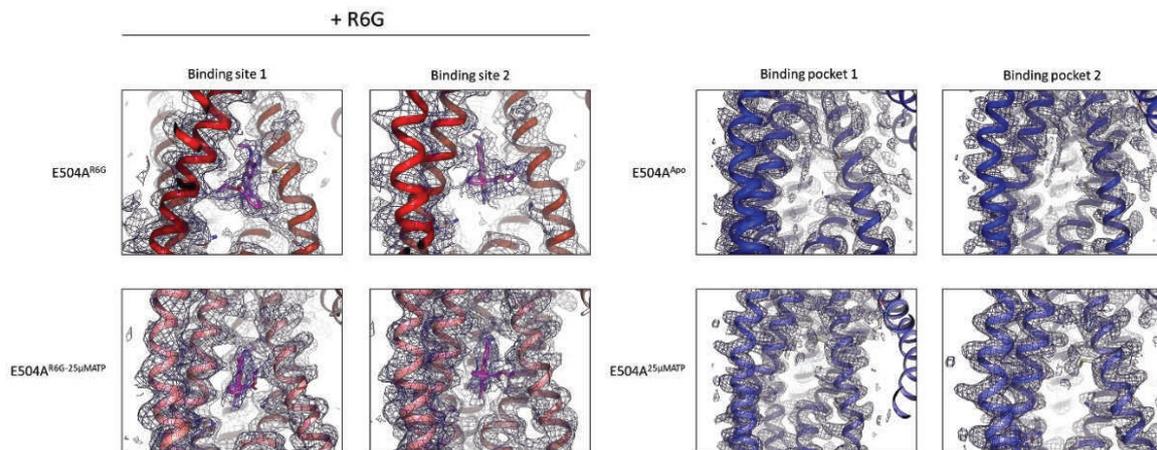


Figure 43 : Carte de cryo-EM des sites de fixation de la R6G dans chaque monomère en conformation IF

A gauche, densités au niveau des sites de fixation de la R6G pour les jeux de données avec R6G et à droite pour ceux sans R6G.

Cette étude montre que le comportement michaélien ou allostérique de BmrA résulte d'une succession des mêmes états conformationnels (à cette résolution) atteints avec une dynamique différente.

J'ai ensuite affiné un modèle structural de BmrA à partir des cartes ayant une résolution suffisante (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). A noter que la couleur des modèles correspond à celles des cartes montrées précédemment (Figure 39). Comme la résolution de certaines cartes reste limitée, j'ai pris en compte plusieurs facteurs dans la procédure de génération des modèles. Ceux-ci ont tout d'abord été générés manuellement dans Coot à partir de la structure OF (PDB : 7OW8). Je me suis ensuite servi du logiciel ISOLDE afin de respecter la stéréochimie. En effet, ce dernier utilise la dynamique moléculaire guidée par la carte avec une sphère autour des résidus affinés pour guider l'affinement. Le modèle a ensuite été affiné dans Phenix, puis par plusieurs cycles d'affinement manuel. Plus tard dans cette étude, le programme AlphaFold est arrivé et a été utile pour comparer le modèle affiné avec celui prédit par le programme à double titre. D'une part concernant l'assignement de séquence ; en effet, je cherchais les résidus hydrophobes, en lien avec des motifs structuraux connus, pour les assigner dans la carte et le modèle AlphaFold me l'a confirmé. D'autre part, une nouvelle procédure d'affinement utilisant une empreinte moléculaire pour générer un modèle AlphaFold a été utilisée comme affinement de plusieurs structures présentées ci-dessous (Terwilliger et al. 2022). A ce propos ; je remercie Emmanuel Bettler et Tom Terwilliger pour les échanges que j'ai eu afin de faire fonctionner le service.

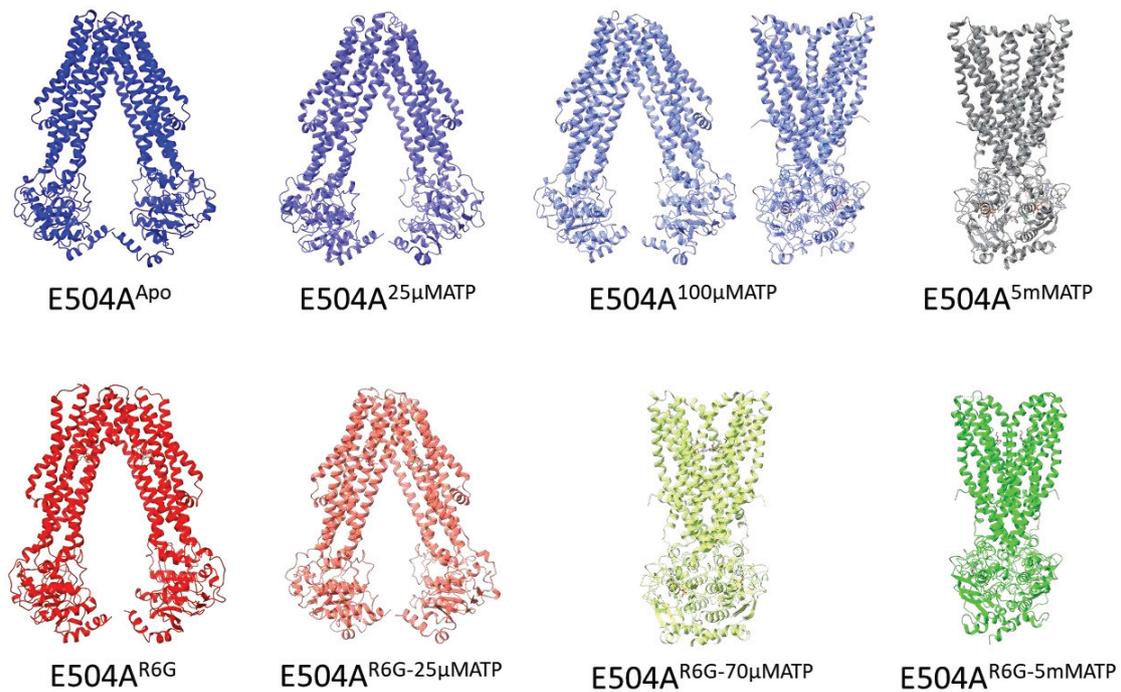


Figure 44 : Modèles de *BmrAE504A* pour chacune des conditions.

Les couleurs des modèles correspondent à celle des cartes présentées en Figure 39.

La superposition des structures Apo ( $E504A^{Apo}$ ) et en présence de R6G ( $E504A^{R6G}$ ) (Figure 45B) montre une réorientation du dimère induite par la R6G. En présence de ligand, il est observé un réarrangement des hélices transmembranaires qui s'écartent depuis la poche de fixation du substrat jusqu'au NBD *via* les hélices transmembranaires. Un écartement de 5 Å des hélices est observé au niveau du site de fixation de la R6G qui s'accroît à 10 Å au niveau des hélices de couplage. Au niveau des NBDs, l'écartement est d'environ 20 Å. En superposant toutes les structures IF (Figure 45C,D), on s'aperçoit que ces deux structures correspondent aux extrêmes d'une série de conformations intermédiaires (décrites plus bas dans l'étude de la variabilité). En effet, en utilisant comme repère la position des hélices transmembranaires autour de la R6G, on observe un continuum de positions entre toutes les structures, mettant en lumière la plasticité de ce transporteur dans cette conformation. Cela est en accord avec la littérature et ce qui est constaté dans toutes les autres structures de transporteurs ABC de type IV dans cette conformation.

A/

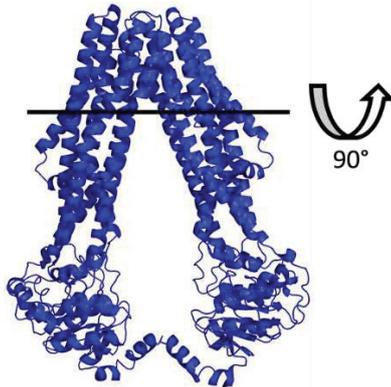
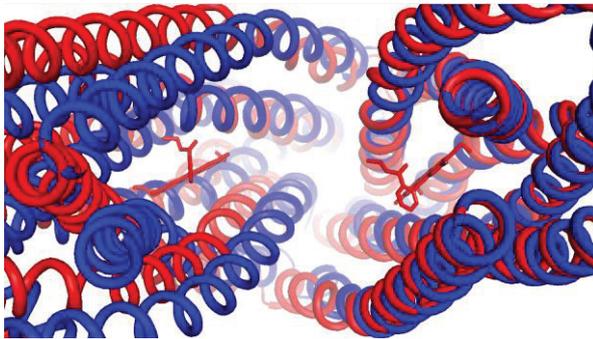


Figure 45 : Superposition des structures en IF

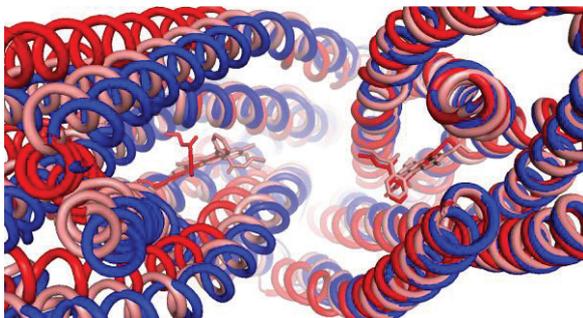
Les vues se font par-dessous au niveau du site de fixation de la R6G, schématisée dans le panel A/.

B/



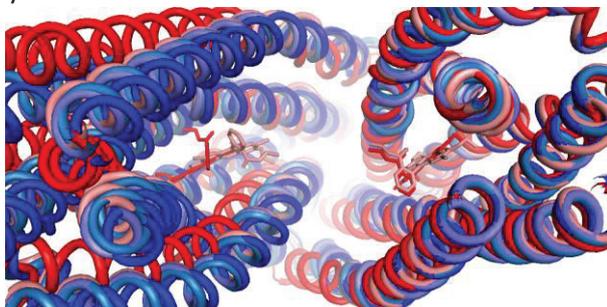
B/ Superposition des structures  $E504A^{Apo}$  et  $E504A^{R6G}$  sur les 3 premières hélices transmembranaires (RMSD = 1,9 Å sur C $\alpha$  de 147 résidus).

C/



C/ Superposition des structures  $E504A^{Apo}$ ,  $E504A^{R6G}$  et  $E504A^{R6G-25\mu MATP}$  (RMSD = 0,8 Å sur C $\alpha$  de 152 résidus entre  $E504A^{R6G-25\mu MATP}$  et  $E504A^{Apo}$ ).

D/



D/ Superposition des structures  $E504A^{Apo}$ ,  $E504A^{R6G}$ ,  $E504A^{R6G-25\mu MATP}$ ,  $E504A^{25\mu MATP}$  et  $E504A^{100\mu MATP}$  (RMSD = 1,3 Å sur C $\alpha$  de 141 résidus entre  $E504A^{25\mu MATP}$  et  $E504A^{Apo}$  et RMSD = 0,8 Å sur C $\alpha$  de 151 résidus entre  $E504A^{100\mu MATP}$  et  $E504A^{Apo}$ )

En conformation OF, la structure de BmrA est bien plus compacte et toutes les structures résolues se superposent bien. Les RMSD sont notés dans la Figure 46. Les NBDs se superposent bien ainsi que le bas des hélices transmembranaires. On observe cependant de la variabilité vers le haut de la structure (Figure 46). Cela étant en lien avec la flexibilité que cette partie de la protéine doit avoir afin qu'elle relargue le substrat. Les variations des boucles TM1-2 sont

en accord avec ce qui avait été observé à partir des structures OF résolues initialement (Chaptal et al. 2022).

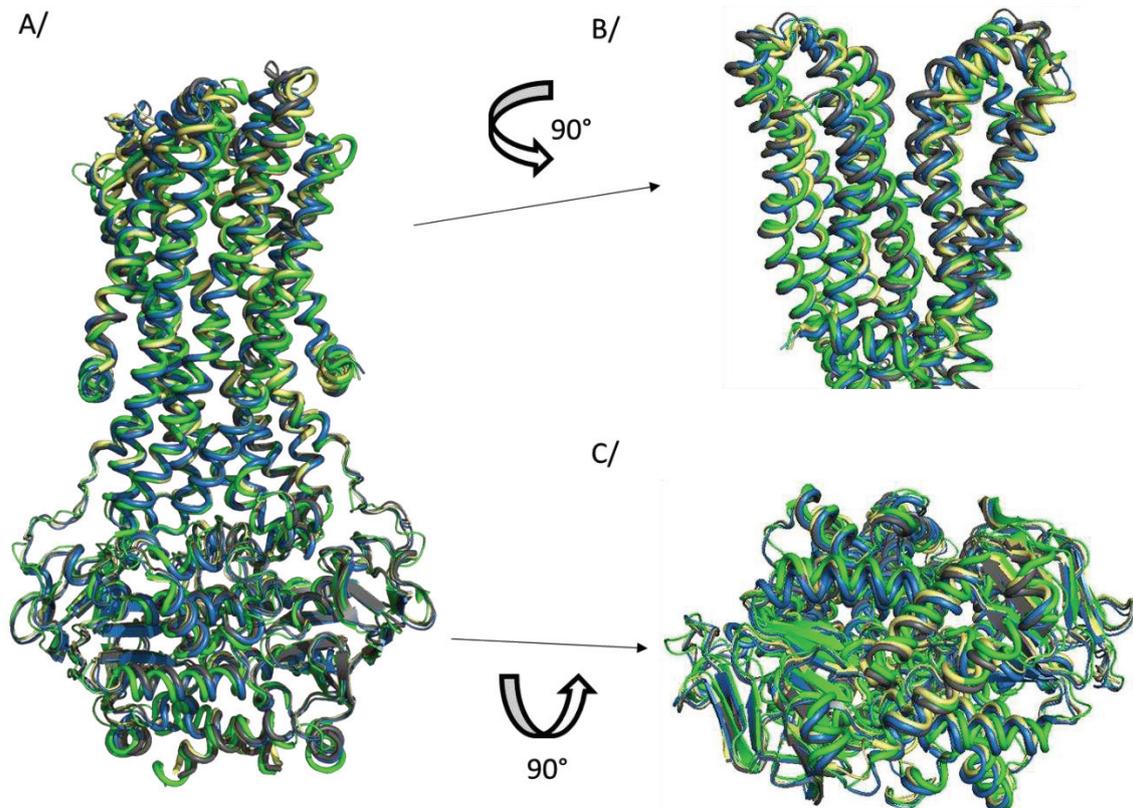


Figure 46 : Superposition des structures en OF

A/ Superposition vue de face

B/ Zoom sur les régions transmembranaires tournées de 90° par rapport à la vue de face

C/ Zoom sur les NBDs vue de dessous

RMSD (7BG4 et 7OW8) = 1,8 Å sur Cα de 140 résidus

RMSD (E504A<sup>55S-70μMATP</sup> et 7OW8) = 1,6 Å sur Cα de 148 résidus

RMSD (E504A<sup>100μMATP</sup> et 7OW8) = 0,8 Å sur Cα de 145 résidus

L'analyse des structures met clairement en avant leur flexibilité. Afin d'investiguer plus en détail ces mouvements, j'ai procédé à l'analyse de la variabilité 3D de BmrA à l'aide des outils 3DVA dans cryoSPARC puis *varref* dans Phenix.

#### b. Variabilité 3D de BmrA

L'étude de la variabilité inter-particules dans les reconstructions cryo-EM est un excellent outil pour visualiser le paysage conformationnel des protéines et l'influence des ligands sur celui-ci. Nous avons calculé cette variabilité en utilisant le logiciel cryoSPARC et l'outil 3DVA (3D Variability Analysis) qui calcule les variances inter-particules et les classent par ordre d'importance en utilisant l'analyse par composante principale demandée, avec l'apparition et la disparition de la densité selon cette trajectoire. Ceci représente un ensemble de probabilité de présence de la protéine dans différentes conformations, et peut être raisonnablement approximé à une trajectoire empruntée par la protéine lors de ses déformations. En

combinant plusieurs trajectoires, il est possible d'avoir une estimation des différentes conformations empruntées par la protéine.

Il est à noter que cryoSPARC vient de sortir un nouvel outil d'étude de variabilité, nommé 3DFlex, qui, d'une part, donne le mouvement selon plusieurs composantes principales pour le rendre plus réaliste et, d'autre part, est doté d'un module d'apprentissage pour recréer la haute résolution sur l'ensemble de la trajectoire. Je suis en cours de fabrication des cartes avec ce nouvel outil pour les comparer. Toutefois, l'intérêt de la 3DVA est que le mouvement est « simplifié » et nous permet donc de l'analyser sans se perdre dans les détails.

J'ai optimisé cette étape afin d'en extraire des informations utiles. Tout d'abord, une mise à jour de l'outil 3DVA entre la version 2 et la version 3 de cryoSPARC a marqué une grosse différence. En effet, à partir de la version 3, je n'observais plus de composante principale correspondant à des variabilités de la ceinture de détergent. Cela m'a permis de me concentrer sur les mouvements de la protéine elle-même. Ensuite, j'ai optimisé le nombre de particules ajoutées pour visualiser au mieux les mouvements globaux plutôt que sur les mouvements de chaînes latérales. A l'étape de la reconstruction à la plus haute résolution, je suis revenue en arrière dans le traitement des données pour inclure des particules qui ajoutaient de la flexibilité ; *i.e* les « mauvaises » particules qui empêchent la haute résolution. Enfin, j'ai beaucoup travaillé sur les masques. J'ai remarqué qu'en le dilatant de plus de 20 Å autour de la protéine, les résultats de variabilité étaient plus clairs et identifiables qu'avec un masque moins dilaté, tout en restant les mêmes.

La variabilité 3D de BmrA a été étudié sur les formes Apo (E504A<sup>Apo</sup>) et R6G (E504A<sup>R6G</sup>) pour voir quel effet la présence du ligand induit sur la dynamique structurale, en absence d'ATP. Les reconstructions finales correspondant à chacune des formes ont été soumises à l'outil « 3D variability analysis » de cryoSPARC sur 3 composantes et en utilisant un masque de la protéine avec détergent et une résolution de 6 Å afin de ne pas être trop réducteur pour la variabilité. Le résultat final donne un ensemble de 20 cartes qui constitue un continuum de conformations qui sont ensuite observables sur ChimeraX sous forme de film. Chaque composante décrit un mouvement distinct de BmrA. Cette analyse capture l'ensemble des conformations discrètes présentes dans le jeu de données et permet alors de se rendre compte de l'hétérogénéité et la flexibilité au sein de l'échantillon. Puis, avec l'outil *varref* de Phenix, un modèle est affiné dans chacune des 20 cartes à partir du modèle à haute résolution.

La Figure 47 ci-dessous montre, pour BmrA en présence de R6G (BmrA<sup>R6G</sup>), 11 des 20 cartes obtenus grâce à l'outil 3DVA ainsi que les modèles correspondants affinés par *varref*.

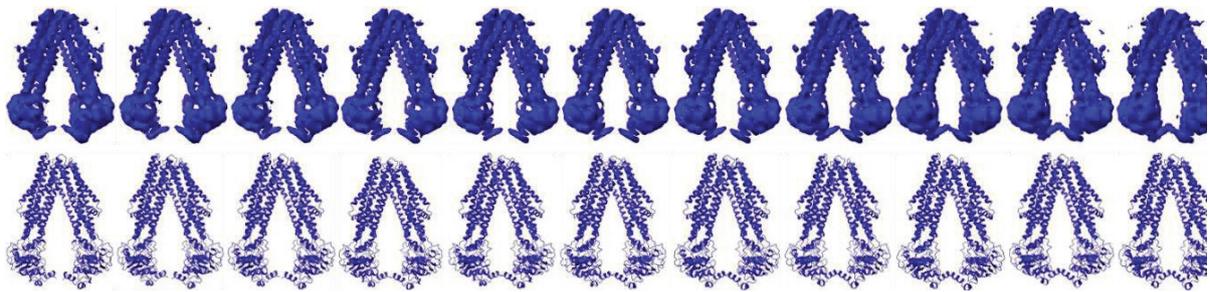


Figure 47 : Cartes et modèles issus du 3DVA pour la composante 1 du jeu BmrA<sup>R6G</sup>

En haut se trouve 11 des 20 cartes générées par 3DVA de cryoSPARC et en dessous les modèles affinés par *varref* dans Phenix. On peut observer un rapprochement des NBDs en bas des cartes, bien modélisé par *varref*.

Ici, je vais me focaliser sur l'analyse des modèles affinés par le logiciel *variability refinement* que j'ai contribué à mettre au point.

Il résulte de l'observation de ces analyses que les mouvements de BmrA Apo et en complexe avec la R6G ne sont pas les mêmes. Le ligand induit un paysage conformationnel différent bien visible sur les films que je montrerai lors de ma soutenance.

On remarque que, pour chaque protéine BmrA<sup>Apo</sup> et BmrA<sup>R6G</sup>, les mouvements décrits sur chaque composante principale sont bien différents, comme attendu (Figure 48). L'amplitude ainsi que la direction des mouvements changent. Les modèles sont représentés avec un dégradé de couleurs pour visualiser plus facilement les mouvements. Les déplacements sont initiés au niveau des domaines transmembranaires et se propagent le long des hélices jusqu'aux NBDs, mettant en relief la connexion entre ces domaines. Les mouvements sont donc plus visibles au niveau du NBD et ont été marqués par des flèches décrivant le mouvement principal. Sur la composante 0, une grande différence est visible entre les deux protéines. BmrA<sup>Apo</sup> montre une grande amplitude de mouvements, qui se retrouve aussi dans les autres composantes dans des directions différentes. En revanche, BmrA<sup>R6G</sup> est beaucoup plus rigide et montre des mouvements de faible amplitude. Cette réduction de mobilité correspond au sens du rapprochement des domaines l'un vers l'autre dans un sens « direct » alors que sur les autres composantes, la protéine effectue des mouvements latéraux ou de cisaillement.

La présence de la R6G entraîne donc une rigidité de BmrA dans le sens du rapprochement direct. Pour se fermer, BmrA doit tourner autour du substrat et passer « sur le côté ». Par conséquent, les 2 NBDs vont se rencontrer d'un côté, formant ainsi un 1<sup>er</sup> site de fixation de l'ATP, puis du 2<sup>ème</sup> côté pour se fermer complètement. Cela est en lien avec l'allostérie vue Figure 39, et la formation d'un site, puis de l'autre. En passant sur le côté, il y a donc formation d'un site en premier et donc la création de cette différenciation des 2 NBDs, autrement symétriques. Ceci met en perspective la coopération moléculaire entre les sites de fixation du substrat et de l'ATP, pourtant distants de 70 Å, et leur relation allostérique.

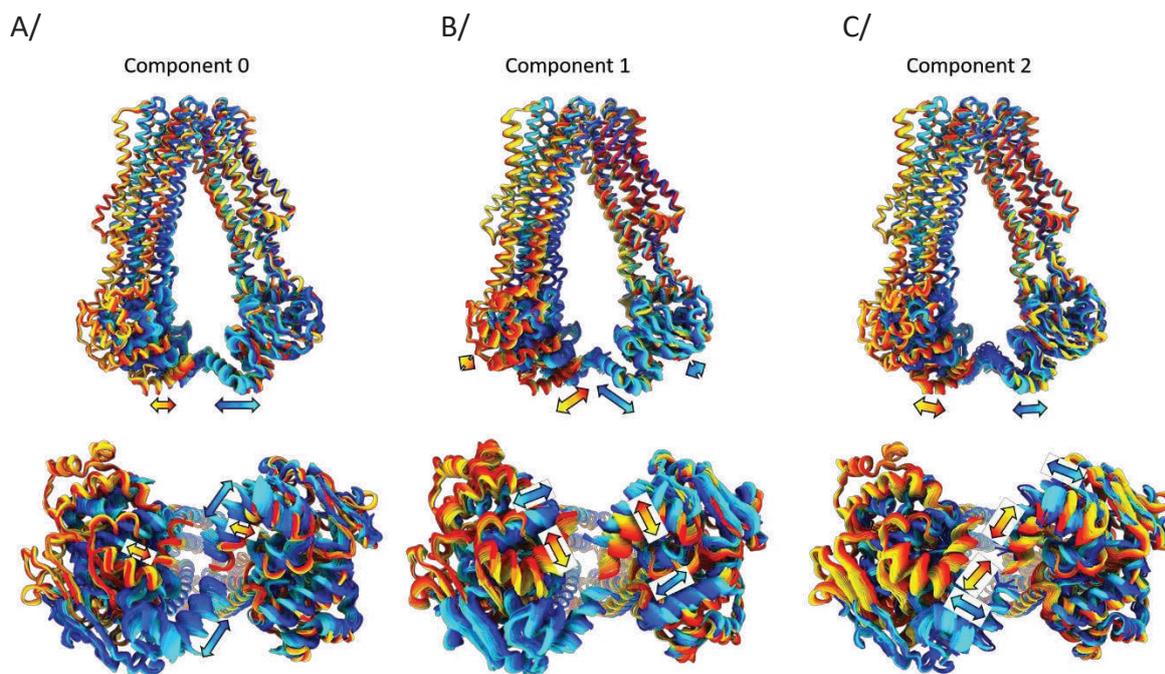


Figure 48 : Variabilité 3D de E504A<sup>Apo</sup> et E504A<sup>R6G</sup>

Résultats obtenus grâce au 3D *variability analysis* de CryoSPARC sur les modèles IF sans R6G (E504A<sup>Apo</sup>) correspondant à la carte bleue de la Figure 39 (gradient du cyan au bleu intense) et avec R6G (E504A<sup>R6G</sup>) correspondant à la carte rouge sur la Figure 39 (gradient jaune à rouge). Les analyses ont été réalisées sur 3 composantes (A, B et C). L'ensemble des modèles a été acquis grâce au 3D *variability refinement* de Phenix.

Les flèches en gradient de couleur indiquent le sens du mouvement.

Pour information, ces expériences sont complétées par de la dynamique moléculaire en collaboration avec Raphaël Terreux (LBTI), dont les premiers résultats confirment les analyses présentées ci-dessus. Les répliques sont en cours et se finissent au moment où je soumetts ce manuscrit. L'équipe a complété ces données avec l'étude de l'influence d'autres ligands sur le comportement allostérique de l'ATP (expériences de Loïck Moissonnier). Les autres substrats testés montrent ce même comportement allostérique, mais avec des nombres de Hill différents, suggérant que cette communication est un mécanisme général de réponse pour BmrA mais que sa plasticité permet toutefois de s'adapter à chaque substrat.

### c. Discussion des résultats

Ces résultats mettent en lumière la plasticité du transporteur BmrA en IF et OF qui se manifeste par des changements de conformations locaux indispensables à sa fonction. En conformation OF, elle permet la libération du substrat alors qu'en IF, elle permet sa reconnaissance et la fixation d'ATP pour initier le « cycle de transport ».

En plus de cette plasticité, mes résultats mettent en évidence l'adaptation du transporteur à ses substrats. La fixation de ces derniers rigidifie une partie de la structure en empêchant les mouvements de rapprochements face-à-face, tout en laissant les mouvements dans les autres directions possibles, rotations et translations sur le côté par exemple. Cela permet à BmrA

d'adopter un chemin conformationnel distinct et un passage plus rapide de la population protéique vers la forme OF.

Ces résultats nous permettent de proposer le modèle suivant (Figure 49) : En absence de substrat, BmrA explore tout un paysage conformationnel qui lui permet de rapprocher *in-fine* les deux NBDs et de basculer vers la conformation OF. En présence de R6G, la fermeture des NBDs face-à-face n'est pas possible donc BmrA se ferme d'un côté, entraînant la formation d'un 1<sup>er</sup> site de fixation d'ATP puis du 2<sup>ème</sup> côté pour former le 2<sup>ème</sup> site et atteindre la conformation occluse puis OF. Cette dynamique conformationnelle témoigne de l'allostérie du site de fixation des substrats sur celui de l'ATP. Ce changement de conformation « contraint » par la R6G induit une fermeture plus immédiate du transporteur et une transition de population de IF vers OF plus rapide. Ceci pourrait constituer un avantage sélectif pour la bactérie dans les phases où la concentration d'ATP intracellulaire est faible ; la présence de la molécule à expulser permettrait une transition IF vers OF plus rapide sans utilisation de plus grande concentration d'ATP, protégeant la bactérie plus rapidement et efficacement. Ces conditions se retrouvent par exemple dans les phases de sporulation ou de faibles quantités de nourriture, conditions qui se retrouvent dans le sol par exemple, milieu endogène de *B. subtilis* (Fribourg et al. 2014).

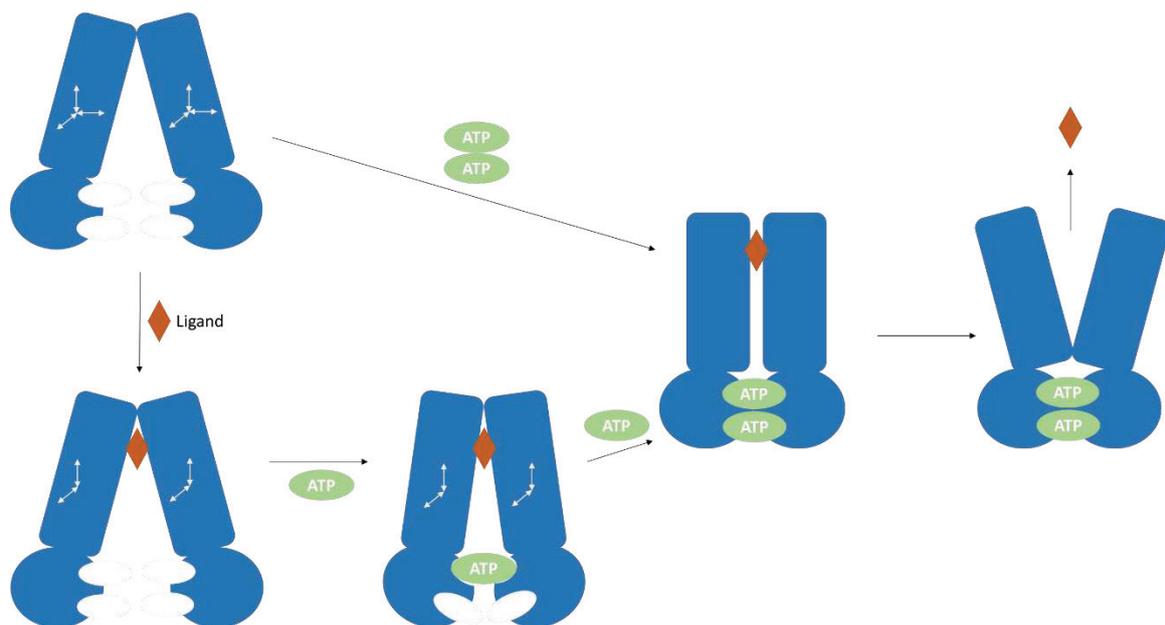


Figure 49 : Modèle du mécanisme d'efflux du substrat

En absence de ligand, BmrA est flexible dans toutes les directions alors qu'en sa présence les mouvements dans la direction x de l'espace sont abolis. La protéine fixe un 1<sup>er</sup> ATP et ferme les NBDs d'un côté puis fixe un 2<sup>ème</sup> ATP et se ferme complètement.

Hypothétiquement, cette adaptation permettrait à la bactérie de réagir plus rapidement dans les conditions où l'ATP est en faible quantité. En revanche, à forte concentration, les vitesses de changement de conformation de BmrA ne posent pas de problème, les formes avec ou sans substrats changent de conformation à la même vitesse. Pour confirmer cette hypothèse, les vitesses d'hydrolyse d'ATP ont été mesurées pour différentes concentrations d'ATP et de R6G

(expériences de Loïck Moissonnier). Ces expériences montrent qu'en présence de R6G, il y a une augmentation de l'hydrolyse d'ATP dans les gammes de concentrations d'ATP correspondant à la transition allostérique (20-200  $\mu$ M ATP), résultats non observés en absence de R6G. Cela est en accord avec le fait que cette dernière augmente la probabilité de passage de la forme IF vers OF, et donc en conséquence augmente la probabilité d'hydrolyse d'ATP.

Les résultats présentés peuvent être comparés aux modèles d'allostérie de Monod-Wyman-Changeux (MWC) ou de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF). Le premier cas promeut que les changements de conformation ne sont pas induits par le ligand mais sont plutôt établis par des équilibres conformationnels entre des états discrets, indépendamment du ligand ou de son taux d'occupation et que ces états sont stabilisés par les ligands. Le 2<sup>ème</sup> modèle pointe la nécessité d'un changement induit par le ligand (« induced-fit ») qui déformerait la structure en la faisant passer par des intermédiaires stables. Ce modèle implique des changements progressifs de conformation. Mes résultats montrent qu'une part de chaque modèle peut être utilisée pour expliquer le phénomène d'allostérie observé dans BmrA. Le ligand R6G ne stabilise pas une conformation particulière mais sélectionne ou focalise un spectre conformationnel de déformation. La notion d'« induced-fit » peut aussi être trouvée dans les déformations plastiques de BmrA et le fait que différents substrats ont des nombres de Hill différents signifiant une adaptation un peu différente à chaque substrat.

D'une manière générale, ces résultats mettent en exergue l'adaptabilité structurale des transporteurs de multiples-drogues à leurs substrats.

## Conclusion

Les protéines membranaires sont impliquées dans de nombreux processus biologiques et à ce titre constituent des cibles thérapeutiques importantes. Une partie d'entre-elles est impliquée dans l'export d'antibiotiques hors des bactéries. La compréhension de leurs mécanismes est essentielle pour diminuer la résistance des organismes qui représente actuellement un fléau. L'un des acteurs majeurs de cette résistance est les pompes d'efflux, famille de protéines membranaires à laquelle appartient les transporteurs ABC. Cette famille adopte 2 conformations pour exercer sa fonction de transporteur, dans lesquelles le site de liaison de la molécule à faire passer d'un compartiment à l'autre est accessible soit de l'intérieur (inward-facing, IF) soit de l'extérieur (outward-facing, OF)

Mon projet de thèse a porté sur un membre de cette famille, BmrA, un transporteur ABC de type IV de *B. subtilis* qui présente une similarité de séquence avec la glycoprotéine-P humaine impliquée dans la résistance aux anticancéreux. BmrA a servi de modèle, à la fois pour des développements méthodologiques qui améliorent la gestion du caractère amphiphile des protéines membranaires, et pour réaliser une étude fondamentale apportant de nouvelles connaissances structurales et fonctionnelles du mécanisme d'efflux de molécules qu'il réalise. Les protéines membranaires possèdent des spécificités propres en raison de leur nature amphiphile qui nécessite des mises au point de chacune des étapes de leur étude. La première, concerne leur surexpression, qui peut provoquer une toxicité pour l'organisme-hôte, et plusieurs techniques ont été développées pour supprimer ou contourner le problème. J'ai par exemple montré que la coexpression de BmrA avec la cavéoline favorise la formation de membrane dans laquelle s'insère BmrA, en quantité plus faible mais avec une activité plus forte.

Malgré le développement de nombreux systèmes amphiphiles permettant de maintenir les protéines membranaires en solution, l'utilisation de détergents pour leur étude reste encore largement employée. Durant la purification, il est nécessaire de concentrer la protéine afin de réaliser des études structurales, une phase durant laquelle la solution passe à travers un filtre sous l'action de la force centrifuge et qui permet d'enrichir la solution en protéine mais aussi en détergent. Or, l'abondance de ce dernier tend à diminuer la qualité des données obtenues. Pour pallier à ce problème, j'ai établi que les détergents sont des fluides non-newtoniens dont la présence de biomolécules renforcent leur comportement colloïdal, qui peut toutefois être limité en réduisant les forces de scission auxquels ils sont soumis lors de la centrifugation.

Grâce à la cryo-EM, il est désormais possible d'observer la couronne amphiphile sur les reconstructions 3D des protéines membranaires. Elle intervient dans l'alignement des particules et statistiquement, la carte résultante correspond à un minimum commun, indépendamment de la nature de cette ceinture.

Au sein de l'équipe, la résolution de la première structure d'un transporteur ABC en conformation OF en complexe avec un substrat a mis en avant la flexibilité de la région transmembranaire de BmrA afin d'ouvrir la cavité contenant le substrat et l'exporter. L'hydrophobicité de la poche conduit ensuite le transporteur à se refermer puis l'hydrolyse de l'ATP permet son retour à l'état IF initial. Afin d'explorer les détails structuraux de ce phénomène, j'ai résolu la structure de plusieurs intermédiaires conformationnels de la transition IF vers OF. BmrA passe d'un comportement michaélien à allostérique vis-à-vis de

l'ATP-Mg<sup>2+</sup> en présence d'un substrat. Pour comprendre ce phénomène, j'ai utilisé un nouvel outil qui donne accès à la variabilité 3D d'une protéine. Appliquée sur des structures de BmrA obtenues dans plusieurs conditions, l'analyse de la dynamique a montré que la liaison du substrat contraint les mouvements de la protéine et la conduit à adopter un chemin conformationnel distinct de celui qu'elle emprunte lorsqu'il n'est pas lié. La présence de R6G améliore l'affinité de BmrA pour l'ATP-Mg<sup>2+</sup> et la conformation OF est atteinte par une fermeture « séquentielle » des NBDs. La protéine fixe un premier nucléotide se fermant ainsi d'un côté puis elle fixe le 2<sup>ème</sup> et se ferme complètement pour adopter la conformation occluse. Dans ce cas, la transition de IF vers OF s'effectue sur une gamme de concentration d'ATP-Mg<sup>2+</sup> réduite. L'étude de la variabilité 3D de BmrA a contribué à améliorer la compréhension de son mécanisme en apportant des informations structurales jusque-là inaccessibles.

### III. Matériel et méthodes

#### a. Expression

##### *Transformation*

Un microlitre d'ADN plasmidique pET15b-BmrAE504A de concentration 210 ng/μL sont ajoutés à 100 μL de bactéries de la souche *E. coli* C43(DE3) ΔAcrB compétentes. Dans ce vecteur, le gène codant BmrA est fusionné aux codons codant 6-histidine à l'extrémité 5' et possède un gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries sont ensuite incubées 30 min dans la glace et 40 s à 42 °C afin de réaliser un choc thermique. Puis, 300 μL de milieu SOC sont ajoutés aux bactéries et l'ensemble est incubé 1 h à 37 °C sous agitation.

Vingt microlitres de solution bactérienne sont étalés sur une boîte de Pétri contenant un milieu LB-agar-ampicilline 50 μg/μL puis incubation de la boîte pendant une nuit à 37 °C.

##### *Culture et induction*

Une colonie est incubée dans 3 mL de milieu LB contenant 50 μg/mL d'ampicilline pendant 7 h à 37 °C sous agitation. Puis, 30 μL de cette préculture est ajoutée à 1 L de milieu LB-ampicilline et incubée toute la nuit à 22 °C sous agitation. Lorsque la DO atteint 0,6, l'expression de BmrA est induite avec 0,7 mM d'IPTG. L'induction de la culture a lieu pendant 5 h à 22 °C sous agitation puis la culture est centrifugée pendant 15 min à 5 000 xg, 4 °C. Le culot est ensuite stocké à - 80 °C.

##### *Isolation des membranes*

Le culot est suspendu dans 50 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM puis lysé grâce à un broyeur Constant System Ltd. à 1,5 kbar, 4 °C et 3 passages. Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 xg, 30 min, 4 °C et le surnageant est à nouveau centrifugé à 180 000 xg, 4 °C, 1 h. Le culot est suspendu dans 25 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH8,0, 1 mM EDTA et antiprotéases CLAPA 1X et de nouveau centrifugé à 180 000 xg, 4 °C, 1 h. Le culot est suspendu dans 5 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH8,0, 1 mM EDTA, 300 mM sucrose et stocké dans l'azote liquide.

##### *Dosage protéique : méthode BCA*

La concentration protéique est mesurée grâce à une gamme étalon de BSA. Dans une plaque 96 puits, une gamme de 0 à 20 μg de BSA est réalisée. L'échantillon est dilué 10 fois puis deux triplicats de 2 et 4 μL sont testés. L'agent réactif est ajouté puis, après une incubation de 5 min à température ambiante, l'absorbance est lue à 562 nm.

## b. Purification

### *Solubilisation*

Les membranes sont solubilisées à 3 mg/mL dans Tris-HCl 20 mM pH8,0, NaCl 100 mM, glycérol 15%, CLAPA 1X, Triton X-100 4,5% pendant 1 h 20, 4 °C sous agitation. La solution est ensuite centrifugée 40 min, 100 000 xg, 4°C.

### *Chromatographie d'affinité*

Une colonne de 5 mL Ni<sup>2+</sup>-NTA HisTrap est équilibrée avec 25 mL de tapon d'équilibration Tris-HCl 20 mM pH8,0, NaCl 100 mM, glycérol 15 %, CLAPA 1X, Triton X-100 4,5%, imidazole 20 mM. Le surnageant de la solubilisation est chargé sur la colonne équilibrée qui est ensuite lavée avec un tampon de lavage HEPES-NaOH 20 mM pH8,0, NaCl 100 mM, imidazole 20 mM, DDM 0,0675%, Na-Cholate 0,04%. La protéine est ensuite éluée avec le tampon de lavage contenant 200 mM d'imidazole. Les fractions éluées sont réunies puis diluées 10 fois dans du tampon d'élution sans imidazole. La solution est ensuite de nouveau chargée sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon d'équilibration puis la fin de la purification est réalisée de la même manière que la première.

### *Chromatographie d'exclusion stérique*

Les fractions de la purification d'affinité sont regroupées puis concentrées avec un filtre Amicon 50 kDa, à 1 000 xg, 4 °C pendant 10-15 min jusqu'à un volume de 500 µL. Le concentrat est alors injecté sur la colonne Superdex 200 10/300 préalablement équilibrée avec 25 mL de tampon HEPES-NaOH 20 mM pH7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035%, cholate 0,03%. La concentration protéique dans chaque fraction est mesurée à l'aide d'un Nanodrop puis Les fractions sont stockées à 4 °C.

### *SDS-PAGE*

Dix microlitres de chaque fraction sont incubés dans 3,3 µL de tampon de Laemmli 4X composé de Tris-HCl 1 M pH8,0, SDS 8%, Bleu de Bromophénol 0,025%, β-mercaptoéthanol 2,8 M, glycérol 40%.

Le gel de séparation est composé de acrylamide/bis-acrylamide 10%, Tris-HCl 0,4 M pH8,8.

Le gel de concentration est composé de acrylamide/bis-acrylamide 4%, Tris-HCl 0,1 M pH6,8.

Les échantillons sont chargés sur le gel dans du tampon TG-SDS 1X et migrent pendant 15 min à 90 V puis 1 h 30 min à 120 V. Le gel est ensuite coloré pendant 30 min sous agitation dans une solution au Bleu de Coomassie composée de 1% éthanol, 25% isopropanol, 10% acide acétique et 0,025% de Bleu de Coomassie R250. Puis il est décoloré pendant 1 h dans une solution d'acide acétique 10 %.

### c. Etude fonctionnelle

#### Fixation de ligands ou nucléotides

La fixation du ligand ou nucléotide sur BmrA est testée par mesure de la fluorescence intrinsèque de la protéine, soit celle des tryptophanes, en excitant l'échantillon à 290 nm et en regardant l'émission entre 310 et 380 nm. Les données sont acquises avec un spectrofluorimètre SAFAS Xenius à un voltage et des bandes passantes constantes.

Pour la fixation d'ATP-Mg<sup>2+</sup>, 0,5 µM de BmrA sont incubés ou non avec 100 µM de R6G pendant 15 min dans la glace. La mesure est réalisée sur 200 µL dans le même tampon que celui utilisé lors de la chromatographie d'exclusion stérique : HEPES-NaOH 20 mM pH7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035%, Na-Cholate 0,03% et dans des cuves en quartz. Des concentrations croissantes de nucléotides sont ajoutées dans la cuve. Un contrôle négatif avec des résidus tryptophane libres, N-acétyl tryptophanamide (NATA) est réalisé afin d'enlever la fixation non spécifique du ligand.

#### Activité ATPase

L'activité ATPase de BmrA purifiée est mesurée grâce au système couplé suivant :

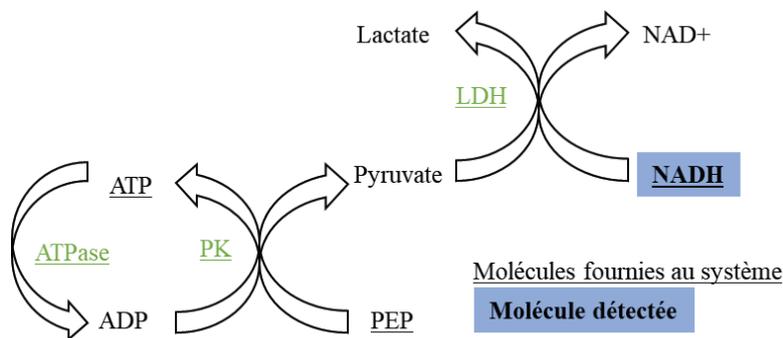


Figure 50 : Schéma réactionnel impliqué dans la mesure de l'activité ATPase

L'activité de BmrA est mesurée par sa capacité d'hydrolyse d'ATP. La régénération de l'ADP en ATP étant proportionnelle à l'oxydation de NADH, la mesure de la disparition du NADH à 340 nm permet de connaître l'activité de BmrA.

L'expérience est réalisée dans une plaque 96 puits. 5 µg de BmrA sont dilués dans HEPES-NaOH 20 mM pH7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035%, NCholate 0,03% qsp 20 µL puis 180 µL de mélange réactionnel composé de ATP-Mg<sup>2+</sup> 5 mM, NADH 0,6 mM, PEP 1 mM, PK 0,1 mg/mL, LDH 0,1 mg/mL, DDM 0,035% et Cholate 0,03% sont ajoutés dans chaque puits. La cinétique est enregistrée pendant 20 min à 30 °C en suivant l'absorbance à 340 nm.

### d. Etude structurale par cryo-EM : préparation des grilles

Concentration de BmrA à 1000 g, 10 min, 4 °C jusqu'à 3,5 mg/mL ou jusqu'à 4 mg/mL lorsqu'elle est en présence de ligands (nucléotides ou R6G). Ajout de R6G 100 µM puis incubation 15 min dans la glace et ajout d'ATP-Mg<sup>2+</sup> aux concentrations désirées (25, 70, 100 ou 5 mM) si présents dans l'échantillon.

Préparation des grilles avec un Vitrobot Mark IV (ThermoFisher) à 22 °C et 100% d'humidité. Les grilles sont hydrophilisées puis 3 µL d'échantillon sont déposés puis application d'un « blot » de force 0 pendant 4 s. La grille est congelée dans de l'éthane liquide et stockée dans l'azote pour être observée sur le microscope ultérieurement. Les grilles utilisées étaient des CFlat 1.2/1.3 (Protochips) et UltraAu 1.2/13 (QuantiFoil).

## REFERENCES

- Akimaru, J, S Matsuyama, H Tokuda, et S Mizushima. 1991. « Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from Escherichia coli. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (15): 6545-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.15.6545>.
- Aller, Stephen G., Jodie Yu, Andrew Ward, Yue Weng, Srinivas Chittaboina, Rupeng Zhuo, Patina M. Harrell, et al. 2009a. « Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5922): 1718-22. <https://doi.org/10.1126/science.1168750>.
- « Anatrice Maltosides ». s. d. Consulté le 27 avril 2023. <https://www.anatrice.com/Products/Detergents/MALTOSIDES/D310>.
- Arechaga, Ignacio, Bruno Miroux, Simone Karrasch, Richard Huijbregts, Ben de Kruijff, Michael J. Runswick, et John E. Walker. 2000. « Characterisation of New Intracellular Membranes in Escherichia Coli Accompanying Large Scale Over-Production of the b Subunit of F1Fo ATP Synthase ». *FEBS Letters* 482 (3): 215-19. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02054-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02054-8).
- Barret, Laurie-Anne, Ange Polidori, Françoise Bonneté, Pierre Bernard-Savary, et Colette Jungas. 2013. « A New High-Performance Thin Layer Chromatography-Based Assay of Detergents and Surfactants Commonly Used in Membrane Protein Studies ». *Journal of Chromatography. A* 1281 (mars): 135-41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.061>.
- Berg van Saparoea, H. Bart van den, Jacek Lubelski, Ronald van Merkerk, Piotr S. Mazurkiewicz, et Arnold J. M. Driessen. 2005. « Proton Motive Force-Dependent Hoechst 33342 Transport by the ABC Transporter LmrA of Lactococcus Lactis ». *Biochemistry* 44 (51): 16931-38. <https://doi.org/10.1021/bi051497y>.
- Bernstein, Harris D., et Janine B. Hyndman. 2001. « Physiological Basis for Conservation of the Signal Recognition Particle Targeting Pathway in Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 183 (7): 2187-97. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2187-2197.2001>.
- Bloois, Edwin van, Henk L. Dekker, Linda Fröderberg, Edith N. G. Houben, Malene L. Urbanus, Chris G. de Koster, Jan-Willem de Gier, et Joen Luirink. 2008. « Detection of Cross-Links between FtsH, YidC, HflK/C Suggests a Linked Role for These Proteins in Quality Control upon Insertion of Bacterial Inner Membrane Proteins ». *FEBS Letters* 582 (10): 1419-24. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.082>.
- Bogdanov, Mikhail, Phillip N. Heacock, et William Dowhan. 2002. « A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition ». *The EMBO Journal* 21 (9): 2107-16. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2107>.
- Brown, Lisa, Julie M. Wolf, Rafael Prados-Rosales, et Arturo Casadevall. 2015. « Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (10): 620-30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
- Campbell, Melody G., Anchi Cheng, Axel F. Brilot, Arne Moeller, Dmitry Lyumkis, David Veessler, Junhua Pan, et al. 2012. « Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy ». *Structure (London, England: 1993)* 20 (11): 1823-28. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.026>.
- Carlson, Michael Luke, John William Young, Zhiyu Zhao, Lucien Fabre, Daniel Jun, Jianing Li, Jun Li, et al. 2018. « The Peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins

- in detergent-free solution ». Édité par Volker Dötsch et Richard Aldrich. *eLife* 7 (août): e34085. <https://doi.org/10.7554/eLife.34085>.
- Chami, Mohamed, Emmanuelle Steinfeld, Cédric Orelle, Jean-Michel Jault, Attilio Di Pietro, Jean-Louis Rigaud, et Sergio Marco. 2002. « Three-Dimensional Structure by Cryo-Electron Microscopy of YvcC, an Homodimeric ATP-Binding Cassette Transporter from *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Molecular Biology* 315 (5): 1075-85. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5309>.
- Chaptal, Vincent, Frédéric Delolme, Arnaud Kilburg, Sandrine Magnard, Cédric Montigny, Martin Picard, Charlène Prier, et al. 2017. « Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins ». *Scientific Reports* 7 (février): 41751. <https://doi.org/10.1038/srep41751>.
- Chaptal, Vincent, Veronica Zampieri, Benjamin Wiseman, Cédric Orelle, Juliette Martin, Kim-Anh Nguyen, Alexia Gobet, et al. 2022. « Substrate-Bound and Substrate-Free Outward-Facing Structures of a Multidrug ABC Exporter ». *Science Advances* 8 (4): eabg9215. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg9215>.
- Chen, Yen-Ju, Owen Pornillos, Samantha Lieu, Che Ma, Andy P. Chen, et Geoffrey Chang. 2007. « X-ray structure of EmrE supports dual topology model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (48): 18999-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709387104>.
- Chitsaz, Mohsen, et Melissa H. Brown. 2017. « The Role Played by Drug Efflux Pumps in Bacterial Multidrug Resistance ». *Essays in Biochemistry* 61 (1): 127-39. <https://doi.org/10.1042/EBC20160064>.
- Civjan, Natanya R., Timothy H. Bayburt, Mary A. Schuler, et Stephen G. Sligar. 2003. « Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by incorporation into nanoscale lipid bilayers ». *BioTechniques* 35 (3): 556-63. <https://doi.org/10.2144/03353rr02>.
- Dalmas, Olivier, Marie-Ange Do Cao, Miguel R. Lugo, Frances J. Sharom, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2005. « Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Shows That the Bacterial Multidrug ABC Half-Transporter BmrA Functions as a Homodimer ». *Biochemistry* 44 (11): 4312-21. <https://doi.org/10.1021/bi0482809>.
- Danmaliki, Gaddafi I., et Peter M. Hwang. 2020. « Solution NMR Spectroscopy of Membrane Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (9): 183356. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183356>.
- Davidson, Amy L., et Jue Chen. 2004. « ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria ». *Annual Review of Biochemistry* 73: 241-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073626>.
- Davies, J., L. Gorini, et B. D. Davis. 1965. « Misreading of RNA Codewords Induced by Aminoglycoside Antibiotics ». *Molecular Pharmacology* 1 (1): 93-106.
- Davies, Julian E., et Shekooh Behroozian. 2020. « An Ancient Solution to a Modern Problem ». *Molecular Microbiology* 113 (3): 546-49. <https://doi.org/10.1111/mmi.14481>.
- Dawson, Roger J.P., et Kaspar P. Locher. 2007. « Structure of the Multidrug ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus Aureus* in Complex with AMP-PNP ». *FEBS Letters* 581 (5): 935-38. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.073>.
- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, et H. Michel. 1985. « Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Centre of *Rhodospseudomonas Viridis* at 3Å Resolution ». *Nature* 318 (6047): 618-24. <https://doi.org/10.1038/318618a0>.

- Dondapati, Srujan Kumar, Marlitt Stech, Anne Zemella, et Stefan Kubick. 2020. « Cell-Free Protein Synthesis: A Promising Option for Future Drug Development ». *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 34 (3): 327-48. <https://doi.org/10.1007/s40259-020-00417-y>.
- Dönhöfer, Alexandra, Sibylle Franckenberg, Stephan Wickles, Otto Berninghausen, Roland Beckmann, et Daniel N. Wilson. 2012. « Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (42): 16900-905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, et al. 2001. « Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5539): 2449-52. <https://doi.org/10.1126/science.1062688>.
- Du, Dijun, Zhao Wang, Nathan R. James, Jarrod E. Voss, Ewa Klimont, Thelma Ohene-Agyei, Henrietta Venter, Wah Chiu, et Ben F. Luisi. 2014. « Structure of the AcrAB–TolC Multidrug Efflux Pump ». *Nature* 509 (7501): 512-15. <https://doi.org/10.1038/nature13205>.
- Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, et P. Schultz. 1988. « Cryo-Electron Microscopy of Vitriified Specimens ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 21 (2): 129-228. <https://doi.org/10.1017/s0033583500004297>.
- DuBois, Michel., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et Fred. Smith. 1956. « Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances ». *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-56. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- E, Palade G. 1953. « Fine structure of blood capillaries ». *J Appl Physics* 24: 1424-48.
- Evans, Richard, Michael O'Neill, Alexander Pritzel, Natasha Antropova, Andrew Senior, Tim Green, Augustin Židek, et al. 2022. « Protein Complex Prediction with AlphaFold-Multimer ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>.
- Fernández-Villa, Daniel, Maria Rosa Aguilar, et Luis Rojo. 2019. « Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (20): 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>.
- Feroz, Hasin, Craig Vandervelden, Bon Ikwuagwu, Bryan Ferlez, Carol S. Baker, Daniel J. Lugar, Mariusz Grzelakowski, John H. Golbeck, Andrew L. Zydney, et Manish Kumar. 2016. « Concentrating Membrane Proteins Using Ultrafiltration without Concentrating Detergents ». *Biotechnology and Bioengineering* 113 (10): 2122-30. <https://doi.org/10.1002/bit.25973>.
- Finkelstein, Joshua M. 2014. « Structures of Membrane Proteins ». *Nature* 511 (7509): 21-21. <https://doi.org/10.1038/nature13372>.
- Floss, Heinz G., et Tin-Wein Yu. 2005. « Rifamycin-Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis ». *Chemical Reviews* 105 (2): 621-32. <https://doi.org/10.1021/cr030112j>.
- Fra, A M, E Williamson, K Simons, et R G Parton. 1995. « De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19): 8655-59.
- Frank, J., M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, et A. Leith. 1996. « SPIDER and WEB: Processing and Visualization of Images in 3D Electron Microscopy and Related Fields ». *Journal of Structural Biology* 116 (1): 190-99. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0030>.

- Fribourg, Pierre Frederic, Mohamed Chami, Carlos Oscar S. Sorzano, Francesca Gubellini, Roberto Marabini, Sergio Marco, Jean-Michel Jault, et Daniel Lévy. 2014. « 3D Cryo-Electron Reconstruction of BmrA, a Bacterial Multidrug ABC Transporter in an Inward-Facing Conformation and in a Lipidic Environment ». *Journal of Molecular Biology* 426 (10): 2059-69. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.002>.
- Furuta, Tadaomi, Yukiko Sato, et Minoru Sakurai. 2016. « Structural Dynamics of the Heterodimeric ABC Transporter TM287/288 Induced by ATP and Substrate Binding ». *Biochemistry* 55 (48): 6730-38. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00947>.
- Ghosh, Chandradhish, Paramita Sarkar, Rahaf Issa, et Jayanta Halder. 2019. « Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance ». *Trends in Microbiology* 27 (4): 323-38. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>.
- GmbH, Jena Bioscience. s. d. « Detergent Screens ». Jena Bioscience. Consulté le 25 octobre 2022. <https://www.jenabioscience.com/crystallography-cryo-em/screening/detergent-screens>.
- Grisshammer, Reinhard. 2006. « Understanding Recombinant Expression of Membrane Proteins ». *Current Opinion in Biotechnology* 17 (4): 337-40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.001>.
- Grkovic, S., M. H. Brown, et R. A. Skurray. 2001. « Transcriptional Regulation of Multidrug Efflux Pumps in Bacteria ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12 (3): 225-37. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0248>.
- Guan, Lan, Michael Ehrmann, Hiroshi Yoneyama, et Taiji Nakae. 1999. « Membrane Topology of the Xenobiotic-Exporting Subunit, MexB, of the MexA,B-OprM Extrusion Pump in *Pseudomonas Aeruginosa* \* ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (15): 10517-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10517>.
- Hassan, Karl A., Scott M. Jackson, Anahit Penesyan, Simon G. Patching, Sasha G. Tetu, Bart A. Eijkelkamp, Melissa H. Brown, Peter J. F. Henderson, et Ian. T. Paulsen. 2013. « Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (50): 20254-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317052110>.
- Hassan, Karl A., Qi Liu, Liam D.H. Elbourne, Irshad Ahmad, David Sharples, Varsha Naidu, Chak Lam Chan, et al. 2018. « Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens ». *Research in Microbiology* 169 (7-8): 450-54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001>.
- He, Xiao, Paul Szewczyk, Andrey Karyakin, Mariah Evin, Wen-Xu Hong, Qinghai Zhang, et Geoffrey Chang. 2010. « Structure of a Cation-Bound Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter ». *Nature* 467 (7318): 991-94. <https://doi.org/10.1038/nature09408>.
- Hegde, Ramanujan S., et Robert J. Keenan. 2022. « The Mechanisms of Integral Membrane Protein Biogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23 (2): 107-24. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00413-2>.
- Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, et K. H. Downing. 1990. « Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron Cryo-Microscopy ». *Journal of Molecular Biology* 213 (4): 899-929. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80271-2).
- Higgins, Christopher F., Ian D. Hiles, George P. C. Salmond, Deborah R. Gill, J. Allan Downie, Ian J. Evans, I. Barry Holland, et al. 1986. « A Family of Related ATP-Binding Subunits

- Coupled to Many Distinct Biological Processes in Bacteria ». *Nature* 323 (6087): 448-50. <https://doi.org/10.1038/323448a0>.
- Higgins, Christopher F., et Kenneth J. Linton. 2004. « The ATP Switch Model for ABC Transporters ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 918-26. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>.
- Hochuli, E. 1990. « Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Adsorbent ». *Genetic Engineering* 12: 87-98. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0641-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0641-2_6).
- Hofmann, Susanne, Dovile Janulienė, Ahmad R. Mehdipour, Christoph Thomas, Erich Stefan, Stefan Brüchert, Benedikt T. Kuhn, et al. 2019. « Conformation Space of a Heterodimeric ABC Exporter under Turnover Conditions ». *Nature* 571 (7766): 580-83. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1391-0>.
- Ionescu, C. M., I. R. Birs, D. Copot, C. I. Muresan, et R. Caponetto. 2020. « Mathematical modelling with experimental validation of viscoelastic properties in non-Newtonian fluids ». *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 378 (2172): 20190284. <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0284>.
- Jardetzky, Oleg. 1966. « Simple Allosteric Model for Membrane Pumps ». *Nature* 211 (5052): 969-70. <https://doi.org/10.1038/211969a0>.
- Javed, Waqas, Sylvain Vallet, Marie-Pierre Clement, Aline Le Roy, Martine Moulin, Michael Härtlein, Cécile Breyton, et al. 2022. « Structural Insights into the Catalytic Cycle of a Bacterial Multidrug ABC Efflux Pump ». *Journal of Molecular Biology* 434 (9): 167541. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167541>.
- Johansen, Nicolai Tidemand, Frederik Grønbaek Tidemand, Martin Cramer Pedersen, et Lise Arleth. 2023. « Travel Light: Essential Packing for Membrane Proteins with an Active Lifestyle ». *Biochimie, Membranes Proteins*, 205 (février): 3-26. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.07.014>.
- Jones, Peter M., et Anthony M. George. 2009. « Opening of the ADP-Bound Active Site in the ABC Transporter ATPase Dimer: Evidence for a Constant Contact, Alternating Sites Model for the Catalytic Cycle ». *Proteins* 75 (2): 387-96. <https://doi.org/10.1002/prot.22250>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. « Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold ». *Nature* 596 (7873): 583-89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kalia, Nitin Pal, Priya Mahajan, Rukmankesh Mehra, Amit Nargotra, Jai Parkash Sharma, Surrinder Koul, et Inshad Ali Khan. 2012. « Capsaicin, a Novel Inhibitor of the NorA Efflux Pump, Reduces the Intracellular Invasion of Staphylococcus Aureus ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (10): 2401-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
- Kapoor, Garima, Saurabh Saigal, et Ashok Elongavan. 2017. « Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians ». *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 33 (3): 300-305. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15).
- Kauss, Tina, Corinne Arpin, Léa Bientz, Phouc Vinh Nguyen, Brune Vialet, Sebastien Benizri, et Philippe Barthélémy. 2020. « Lipid Oligonucleotides as a New Strategy for Tackling the Antibiotic Resistance ». *Scientific Reports* 10 (1): 1054. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58047-x>.
- Khater, Ismail M., Fanrui Meng, Timothy H. Wong, Ivan Robert Nabi, et Ghassan Hamarneh. 2018. « Super Resolution Network Analysis Defines the Molecular Architecture of

- Caveolae and Caveolin-1 Scaffolds ». *Scientific Reports* 8 (1): 9009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27216-4>.
- Kim, JungMin, Shenping Wu, Thomas M. Tomasiak, Claudia Mergel, Michael B. Winter, Sebastian B. Stiller, Yaneth Robles-Colmanares, et al. 2015. « Subnanometre-Resolution Electron Cryomicroscopy Structure of a Heterodimeric ABC Exporter ». *Nature* 517 (7534): 396-400. <https://doi.org/10.1038/nature13872>.
- Kojima, Seiji, et Hiroshi Nikaido. 2013. « Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (28): E2629-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310333110>.
- Krügel, Hans, Andreas Licht, Gesine Biedermann, Andreas Petzold, Jürgen Lassak, Yvonne Hupfer, Bernhard Schlott, et al. 2010. « Cervimycin C Resistance in *Bacillus Subtilis* Is Due to a Promoter Up-Mutation and Increased mRNA Stability of the Constitutive ABC-Transporter Gene *BmrA* ». *FEMS Microbiology Letters* 313 (2): 155-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02143.x>.
- Kühlbrandt, Werner. 2014. « The Resolution Revolution ». *Science* 343 (6178): 1443-44. <https://doi.org/10.1126/science.1251652>.
- Lacabanne, Denis, Cédric Orelle, Lauriane Lecoq, Britta Kunert, Claire Chuilon, Thomas Wiegand, Stéphanie Ravaud, Jean-Michel Jault, Beat H. Meier, et Anja Böckmann. 2019. « Flexible-to-Rigid Transition Is Central for Substrate Transport in the ABC Transporter *BmrA* from *Bacillus Subtilis* ». *Communications Biology* 2: 149. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0390-x>.
- Lacabanne, Denis, Thomas Wiegand, Margot Di Cesare, Cédric Orelle, Matthias Ernst, Jean-Michel Jault, Beat H. Meier, et Anja Böckmann. 2022. « Solid-State NMR Reveals Asymmetric ATP Hydrolysis in the Multidrug ABC Transporter *BmrA* ». *Journal of the American Chemical Society* 144 (27): 12431-42. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c04287>.
- Lee, Ho Jin, Hyun Sung Lee, Taeyeol Youn, Bernadette Byrne, et Pil Seok Chae. 2022. « Impact of Novel Detergents on Membrane Protein Studies ». *Chem* 8 (4): 980-1013. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2022.02.007>.
- Lu, Min, Jindrich Symersky, Martha Radchenko, Akiko Koide, Yi Guo, Rongxin Nie, et Shohei Koide. 2013. « Structures of a Na<sup>+</sup>-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (6): 2099-2104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219901110>.
- Matar-Merheb, Rima, Moez Rhimi, Antoine Leydier, Frédéric Huché, Carmen Galián, Elodie Desuzinges-Mandon, Damien Ficheux, et al. 2011. « Structuring Detergents for Extracting and Stabilizing Functional Membrane Proteins ». *PloS One* 6 (3): e18036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018036>.
- Matthaeus, Claudia, Kem A. Sochacki, Andrea M. Dickey, Dmytro Puchkov, Volker Haucke, Martin Lehmann, et Justin W. Taraska. 2022. « The Molecular Organization of Differentially Curved Caveolae Indicates Bendable Structural Units at the Plasma Membrane ». *Nature Communications* 13 (1): 7234. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34958-3>.
- McIntosh, Deirdre P., Xiang-Yang Tan, Phil Oh, et Jan E. Schnitzer. 2002. « Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: A pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4): 1996-2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.251662398>.

- Mehmood, Shahid, Carmen Domene, Eric Forest, et Jean-Michel Jault. 2012. « Dynamics of a Bacterial Multidrug ABC Transporter in the Inward- and Outward-Facing Conformations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27): 10832-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204067109>.
- Miroux, B., et J. E. Walker. 1996. « Over-Production of Proteins in Escherichia Coli: Mutant Hosts That Allow Synthesis of Some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels ». *Journal of Molecular Biology* 260 (3): 289-98. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>.
- Montigny, Cédric, François Penin, Claire Lethias, et Pierre Falson. 2004. « Overcoming the Toxicity of Membrane Peptide Expression in Bacteria by Upstream Insertion of Asp-Pro Sequence ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1660 (1-2): 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.013>.
- Morais Cabral, J. H., A. P. Jackson, C. V. Smith, N. Shikotra, A. Maxwell, et R. C. Liddington. 1997. « Crystal Structure of the Breakage-Reunion Domain of DNA Gyrase ». *Nature* 388 (6645): 903-6. <https://doi.org/10.1038/42294>.
- Morita, Yuji, Kazuyo Kodama, Sumiko Shiota, Tomoyuki Mine, Atsuko Kataoka, Tohru Mizushima, et Tomofusa Tsuchiya. 1998. « NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of Vibrio parahaemolyticus and Its Homolog in Escherichia coli ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (7): 1778-82.
- Morrison, Kerrie A., Aneel Akram, Ashlyn Mathews, Zoeya A. Khan, Jaimin H. Patel, Chumin Zhou, David J. Hardy, et al. 2016. « Membrane Protein Extraction and Purification Using Styrene-Maleic Acid (SMA) Copolymer: Effect of Variations in Polymer Structure ». *The Biochemical Journal* 473 (23): 4349-60. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160723>.
- Nagamori, Shushi, Irina N. Smirnova, et H. Ronald Kaback. 2004. « Role of YidC in Folding of Polytopic Membrane Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 165 (1): 53-62. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402067>.
- Nazarov, Pavel A. 2022. « MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages ». *Antibiotics* 11 (6): 734. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734>.
- Nguyen, Kim-Anh, Marine Peuchmaur, Sandrine Magnard, Romain Haudecoeur, Cédric Boyère, Saravanan Mounien, Ikram Benammar, et al. 2018. « Glycosyl-Substituted Dicarboxylates as Detergents for the Extraction, Overstabilization, and Crystallization of Membrane Proteins ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 57 (11): 2948-52. <https://doi.org/10.1002/anie.201713395>.
- Nishino, Kunihiro, et Akihito Yamaguchi. 2001. « Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 183 (20): 5803-12. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5803-5812.2001>.
- Nishiyama, K., M. Hanada, et H. Tokuda. 1994. « Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of Escherichia coli at low temperature. » *The EMBO Journal* 13 (14): 3272-77. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06628.x>.
- « Non-Newtonian Fluids ». s. d. Science Learning Hub. Consulté le 31 octobre 2022. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1502-non-newtonian-fluids>.
- Nouwen, Nico, et Arnold J. M. Driessen. 2002. « SecDFyajC Forms a Heterotetrameric Complex with YidC ». *Molecular Microbiology* 44 (5): 1397-1405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02972.x>.

- O'Neill, Jim. 2016. « Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations ». Report. Government of the United Kingdom. United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>.
- Opekarová, M., et W. Tanner. 2003. « Specific Lipid Requirements of Membrane Proteins--a Putative Bottleneck in Heterologous Expression ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1610 (1): 11-22. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00708-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00708-3).
- Orelle, Cédric, Olivier Dalmas, Philippe Gros, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2003a. « The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-Binding Cassette Transporter BmrA ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47002-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308268200>.
- . 2003b. « The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-Binding Cassette Transporter BmrA\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47002-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308268200>.
- Orelle, Cédric, Francesca Gubellini, Anne Durand, Sergio Marco, Daniel Lévy, Philippe Gros, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2008. « Conformational Change Induced by ATP Binding in the Multidrug ATP-Binding Cassette Transporter BmrA ». *Biochemistry* 47 (8): 2404-12. <https://doi.org/10.1021/bi702303s>.
- Overington, John P., Bissan Al-Lazikani, et Andrew L. Hopkins. 2006. « How Many Drug Targets Are There? ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (12): 993-96. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>.
- Parcej, David, et Robert Tampé. 2010. « ABC Proteins in Antigen Translocation and Viral Inhibition ». *Nature Chemical Biology* 6 (8): 572-80. <https://doi.org/10.1038/nchembio.410>.
- Park, Il-Seon, Chun-Hung Lin, et Christopher T. Walsh. 1996. « Gain of d-Alanyl-d-lactate or d-Lactyl-d-alanine Synthetase Activities in Three Active-Site Mutants of the Escherichia coli d-Alanyl-d-alanine Ligase B ». *Biochemistry* 35 (32): 10464-71. <https://doi.org/10.1021/bi9603128>.
- Parton, Robert G., Michael Hanzal-Bayer, et John F. Hancock. 2006. « Biogenesis of Caveolae: A Structural Model for Caveolin-Induced Domain Formation ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 5): 787-96. <https://doi.org/10.1242/jcs.02853>.
- Pelkmans, Lucas, et Marino Zerial. 2005. « Kinase-Regulated Quantal Assemblies and Kiss-and-Run Recycling of Caveolae ». *Nature* 436 (7047): 128-33. <https://doi.org/10.1038/nature03866>.
- Perkins, H. R. 1969. « Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin ». *Biochemical Journal* 111 (2): 195-205.
- Poole, K, K Krebes, C McNally, et S Neshat. 1993. « Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon. ». *Journal of Bacteriology* 175 (22): 7363-72.
- Porta, Jason C., Bing Han, Alican Gulsevin, Jeong Min Chung, Yelena Peskova, Sarah Connolly, Hassane S. Mchaourab, et al. 2022. « Molecular Architecture of the Human Caveolin-1 Complex ». *Science Advances* 8 (19): eabn7232. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn7232>.
- Quentin, Y., G. Fichant, et F. Denizot. 1999. « Inventory, Assembly and Analysis of Bacillus Subtilis ABC Transport Systems ». *Journal of Molecular Biology* 287 (3): 467-84. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2624>.

- Quistgaard, Esben M., Christian Löw, Fatma Guettou, et Pär Nordlund. 2016. « Understanding Transport by the Major Facilitator Superfamily (MFS): Structures Pave the Way ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (2): 123-32. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.25>.
- Raimondi, Vittoria, Alessandro Grinzato, Vittoria Raimondi, et Alessandro Grinzato. 2022. « A Basic Introduction to Single Particles Cryo-Electron Microscopy ». *AIMS Biophysics* 9 (1): 5-20. <https://doi.org/10.3934/biophy.2022002>.
- Ravaud, Stéphanie, Marie-Ange Do Cao, Marie Jidenko, Christine Ebel, Marc Le Maire, Jean-Michel Jault, Attilio Di Pietro, Richard Haser, et Nushin Aghajari. 2006. « The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state ». *Biochemical Journal* 395 (Pt 2): 345-53. <https://doi.org/10.1042/BJ20051719>.
- Reading, C., et M. Cole. 1977. « Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11 (5): 852-57.
- Rewatkar, Prarthana V., Robert G. Parton, Harendra S. Parekh, et Marie-Odile Parat. 2015. « Are Caveolae a Cellular Entry Route for Non-Viral Therapeutic Delivery Systems? » *Advanced Drug Delivery Reviews* 91 (août): 92-108. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.003>.
- Rodríguez-Martínez, José Manuel, María Eliecer Cano, Carmen Velasco, Luis Martínez-Martínez, et Alvaro Pascual. 2011. « Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: An Update ». *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 17 (2): 149-82. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>.
- Romsicki, Yolanda, et Frances J. Sharom. 1999. « The Membrane Lipid Environment Modulates Drug Interactions with the P-Glycoprotein Multidrug Transporter ». *Biochemistry* 38 (21): 6887-96. <https://doi.org/10.1021/bi990064q>.
- Roosild, Tarmo P., Jason Greenwald, Mark Vega, Samantha Castronovo, Roland Riek, et Senyon Choe. 2005. « NMR Structure of Mistic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expression ». *Science* 307 (5713): 1317-21. <https://doi.org/10.1126/science.1106392>.
- Rotem, Dvir, et Shimon Schuldiner. 2004. « EmrE, a Multidrug Transporter from *Escherichia Coli*, Transports Monovalent and Divalent Substrates with the Same Stoichiometry\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 48787-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408187200>.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, et R. G. Anderson. 1992. « Caveolin, a Protein Component of Caveolae Membrane Coats ». *Cell* 68 (4): 673-82. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90143-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-z).
- Schnitzer, J. E. 2001. « Caveolae: From Basic Trafficking Mechanisms to Targeting Transcytosis for Tissue-Specific Drug and Gene Delivery in Vivo ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 49 (3): 265-80. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00141-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00141-7).
- Schwarz, Daniel, Volker Dötsch, et Frank Bernhard. 2008. « Production of Membrane Proteins Using Cell-Free Expression Systems ». *Proteomics* 8 (19): 3933-46. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800171>.
- Seeger, Markus A., André Schiefner, Thomas Eicher, François Verrey, Kay Diederichs, et Klaus M. Pos. 2006. « Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5791): 1295-98. <https://doi.org/10.1126/science.1131542>.

- Senior, A. E., M. K. al-Shawi, et I. L. Urbatsch. 1995. « The Catalytic Cycle of P-Glycoprotein ». *FEBS Letters* 377 (3): 285-89. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01345-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01345-8).
- Shikata, Toshiyuki, Hirotaka Hirata, Eiichi Takatori, et Kunihiro Osaki. 1988. « Nonlinear Viscoelastic Behavior of Aqueous Detergent Solutions ». *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* 28 (2): 171-82. [https://doi.org/10.1016/0377-0257\(88\)85038-9](https://doi.org/10.1016/0377-0257(88)85038-9).
- Shin, Jonghyeok, Young-Hun Jung, Da-Hyeong Cho, Myungseo Park, Kyung Eun Lee, Yoosoo Yang, Cherlhyun Jeong, et al. 2015. « Display of Membrane Proteins on the Heterologous Caveolae Carved by Caveolin-1 in the Escherichia Coli Cytoplasm ». *Enzyme and Microbial Technology* 79-80 (novembre): 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.018>.
- Shin, Jonghyeok, Jiwon Yu, Myungseo Park, Chakhee Kim, Hooyeon Kim, Yunjeong Park, Choongjin Ban, et al. 2019. « Endocytosing Escherichia Coli as a Whole-Cell Biocatalyst of Fatty Acids ». *ACS Synthetic Biology* 8 (5): 1055-66. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00519>.
- Smith, Paul C., Nathan Karpowich, Linda Millen, Jonathan E. Moody, Jane Rosen, Philip J. Thomas, et John F. Hunt. 2002. « ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer ». *Molecular cell* 10 (1): 139-49.
- Steinfelds, Emmanuelle, Cédric Orelle, Olivier Dalmas, François Penin, Bruno Miroux, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2002. « Highly Efficient Over-Production in E. Coli of YvcC, a Multidrug-like ATP-Binding Cassette Transporter from Bacillus Subtilis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1565 (1): 1-5. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00515-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00515-1).
- Steinfelds, Emmanuelle, Cédric Orelle, Jean-Raphaël Fantino, Olivier Dalmas, Jean-Louis Rigaud, François Denizot, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2004. « Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in Bacillus Subtilis ». *Biochemistry* 43 (23): 7491-7502. <https://doi.org/10.1021/bi0362018>.
- Strop, Pavel, et Axel T. Brunger. 2005. « Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 14 (8): 2207-11. <https://doi.org/10.1110/ps.051543805>.
- « Surfactants & critical micelle concentration (CMC) - DataPhysics Instruments ». s. d. Consulté le 24 octobre 2022. <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>.
- Syberg, Falk, Yan Suveyzdis, Carsten Kötting, Klaus Gerwert, et Eckhard Hofmann. 2012. « Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Nucleotide-Binding Domain from the ATP-Binding Cassette Transporter MsbA: ATP Hydrolysis Is the Rate-Limiting Step in the Catalytic Cycle ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (28): 23923-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359208>.
- Tate, C. G. 2001. « Overexpression of Mammalian Integral Membrane Proteins for Structural Studies ». *FEBS Letters* 504 (3): 94-98. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02711-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02711-9).
- Tenson, Tanel, Martin Lovmar, et Måns Ehrenberg. 2003. « The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome ». *Journal of Molecular Biology* 330 (5): 1005-14. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00662-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00662-4).
- Terwilliger, Thomas C., Billy K. Poon, Pavel V. Afonine, Christopher J. Schlicksup, Tristan I. Croll, Claudia Millán, Jane S. Richardson, Randy J. Read, et Paul D. Adams. 2022. « Improved

- AlphaFold Modeling with Implicit Experimental Information ». *Nature Methods* 19 (11): 1376-82. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01645-6>.
- Thomas, Christoph, et Robert Tampé. 2020. « Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters ». *Annual Review of Biochemistry* 89 (juin): 605-36. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105201>.
- Thonghin, Nopnithi, Vasileios Kargas, Jack Clews, et Robert C. Ford. 2018. « Cryo-Electron Microscopy of Membrane Proteins ». *Methods (San Diego, Calif.)* 147 (septembre): 176-86. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.018>.
- Tipper, D J, et J L Strominger. 1965. « Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (4): 1133-41.
- Touat, Mehdi, Marion Opatowski, Christian Brun-Buisson, Kristel Cosker, Didier Guillemot, Jerome Salomon, Philippe Tuppin, Gregoire de Lagasnerie, et Laurence Watier. 2019. « A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France: A Matched Case–Control Study ». *Applied Health Economics and Health Policy* 17 (3): 381-89. <https://doi.org/10.1007/s40258-018-0451-1>.
- Tran, John H., George A. Jacoby, et David C. Hooper. 2005. « Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with Escherichia coli Topoisomerase IV ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 3050-52. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3050-3052.2005>.
- Tribet, C., R. Audebert, et J. L. Popot. 1996. « Amphipols: Polymers That Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15047-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15047>.
- Unwin, P. N., et R. Henderson. 1975. « Molecular Structure Determination by Electron Microscopy of Unstained Crystalline Specimens ». *Journal of Molecular Biology* 94 (3): 425-40. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90212-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90212-0).
- Valent, Q. A., J. W. de Gier, G. von Heijne, D. A. Kendall, C. M. ten Hagen-Jongman, B. Oudega, et J. Luirink. 1997. « Nascent Membrane and Presecretory Proteins Synthesized in Escherichia Coli Associate with Signal Recognition Particle and Trigger Factor ». *Molecular Microbiology* 25 (1): 53-64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4431808.x>.
- Veal, Wendy L., et William M. Shafer. 2003. « Identification of a Cell Envelope Protein (MtrF) Involved in Hydrophobic Antimicrobial Resistance in Neisseria Gonorrhoeae ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg031>.
- Veen, H W van, K Venema, H Bolhuis, I Oussenko, J Kok, B Poolman, A J Driessen, et W N Konings. 1996. « Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 10668-72.
- Wagner, Samuel, Mirjam Lerch Bader, David Drew, et Jan-Willem de Gier. 2006. « Rationalizing Membrane Protein Overexpression ». *Trends in Biotechnology* 24 (8): 364-71. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.008>.
- Wagner, Samuel, Mirjam M. Klepsch, Susan Schlegel, Ansgar Appel, Roger Draheim, Michael Tarry, Martin Högbom, et al. 2008. « Tuning Escherichia Coli for Membrane Protein Overexpression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38): 14371-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804090105>.

- Walker, J E, M Saraste, M J Runswick, et N J Gay. 1982. « Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. » *The EMBO Journal* 1 (8): 945-51.
- Wallin, E., et G. von Heijne. 1998. « Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. » *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 7 (4): 1029-38.
- Walser, Piers J., Nicholas Ariotti, Mark Howes, Charles Ferguson, Richard Webb, Dominik Schwudke, Natalya Leneva, et al. 2012. « Constitutive Formation of Caveolae in a Bacterium ». *Cell* 150 (4): 752-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.042>.
- Wang, Yang, Baobao Liu, Daniel Grenier, et Li Yi. 2019. « Regulatory Mechanisms of the LuxS/AI-2 System and Bacterial Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (10): e01186-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01186-19>.
- Ward, Andrew B., Paul Szewczyk, Vinciane Grimard, Chang-Wook Lee, Lorena Martinez, Rupak Doshi, Alexandra Caya, et al. 2013. « Structures of P-Glycoprotein Reveal Its Conformational Flexibility and an Epitope on the Nucleotide-Binding Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (33): 13386-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309275110>.
- Weisblum, B. 1995. « Erythromycin Resistance by Ribosome Modification ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (3): 577-85. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.577>.
- Westfahl, Kathryn M., Jacqueline A. Merten, Adam H. Buchaklian, et Candice S. Klug. 2008. « Functionally Important ATP Binding and Hydrolysis Sites in Escherichia coli MsbA ». *Biochemistry* 47 (52): 13878-86. <https://doi.org/10.1021/bi801745u>.
- « What Is Antibiotic Resistance? | BioMérieux, Antimicrobial Resistance ». s. d. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE* (blog). Consulté le 6 octobre 2022. <https://amr.biomerieux.com/en/about-amr/what-is-antibiotic-resistance/>.
- Wise, E M, et J T Park. 1965. « Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (1): 75-81.
- Wong, Kaichung, Tony Chen, David E. Connor, Masud Behnia, et Kurosh Parsi. 2015. « Basic Physiochemical and Rheological Properties of Detergent Sclerosants ». *Phlebology* 30 (5): 339-49. <https://doi.org/10.1177/0268355514529271>.
- Yan, Nieng. 2013. « Structural Advances for the Major Facilitator Superfamily (MFS) Transporters ». *Trends in Biochemical Sciences* 38 (3): 151-59. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.003>.
- Yerushalmi, H., et S. Schuldiner. 2000. « A Common Binding Site for Substrates and Protons in EmrE, an Ion-Coupled Multidrug Transporter ». *FEBS Letters* 476 (1-2): 93-97. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01677-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01677-x).
- Yoneyama, H., et T. Nakae. 1993. « Mechanism of Efficient Elimination of Protein D2 in Outer Membrane of Imipenem-Resistant Pseudomonas Aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (11): 2385-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2385>.
- Zampieri, Veronica, Cécile Hilpert, Mélanie Garnier, Yannick Gestin, Sébastien Delolme, Juliette Martin, Pierre Falson, Guillaume Launay, et Vincent Chaptal. 2021. « The Det.Belt Server: A Tool to Visualize and Estimate Amphipathic Solvent Belts around Membrane Proteins ». *Membranes* 11 (7): 459. <https://doi.org/10.3390/membranes11070459>.