



HAL
open science

Etude fonctionnelle et structurale du transporteur de multiple drogues, BmrA, en condition d'équilibre et en temps résolu. Caractérisation structurale de BmrA en liposome par cryoEM

Loïck Moissonnier

► **To cite this version:**

Loïck Moissonnier. Etude fonctionnelle et structurale du transporteur de multiple drogues, BmrA, en condition d'équilibre et en temps résolu. Caractérisation structurale de BmrA en liposome par cryoEM. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10213 . tel-04886460

HAL Id: tel-04886460

<https://theses.hal.science/tel-04886460v1>

Submitted on 14 Jan 2025

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**

Ecole Doctorale N° 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaires Sciences Santé

Discipline : Biochimie

Soutenue publiquement le 08/11/2024, par :

Loïck Moissonnier

**Etude fonctionnelle et structurale du transporteur
de multiple drogues, BmrA, en condition
d'équilibre et en temps résolu. Caractérisation
structurale de BmrA en liposome par cryoEM.**

Devant le jury composé de :

Pr. Boschi-Muller Sandrine	Professeur des universités, Laboratoire d'Ingénierie moléculaire et physiopathologie articulaire	Rapporteure
Dr. Broutin Isabelle	Directrice de recherche, Laboratoire Cibles thérapeutiques et conception de médicaments	Rapporteure
Dr. Picard Martin	Directeur de recherche, Laboratoire Biochimie des protéines membranaires	Président
Dr. Maniti Ofélia	Maître de conférences, Institut de chimie et biochimie moléculaires et supramoléculaires	Examinatrice
Dr. Chaptal Vincent	Chargé de recherche, Laboratoire de Microbiologie moléculaire et biochimie structurale	Directeur de thèse
Dr. Falson Pierre	Directeur de recherche, Laboratoire de Microbiologie moléculaire et biochimie structurale	Directeur de thèse

Résumé de la thèse

Selon l'organisation mondiale de la santé, la résistance aux antibiotiques est un problème majeur pour l'humanité en raison de l'émergence de bactérie multi-résistantes. L'émergence de ces résistances chez les bactéries provient du fait qu'elles sont capables de mettre en place de nombreuses stratégies pour empêcher les antibiotiques de fonctionner. En particulier, la première ligne de défense de ces bactéries est la surexpression de transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) qui expulsent les antibiotiques en dehors de la cellule bactérienne, diminuant leurs concentrations sous leurs seuils de cytotoxicité. Plus de 50 ans d'études sur ces transporteurs ABC ont permis à la communauté scientifique d'établir un mécanisme global, notamment grâce à l'acquisition de structures 3D de plus en plus nombreuses. Ceci a été étroitement lié à l'évolution technologique et méthodologique de la biologie structurale ces dernières années avec notamment l'émergence de la cryoEM. Plus les connaissances avancent plus les questions deviennent précises, et il demeure toujours de nombreuses questions sur la compréhension de leur fonctionnement.

Dans le cadre de mon projet, j'ai étudié BmrA, l'un de ces transporteur ABC exprimé chez *Bacillus subtilis* qui lui confère une résistance à la cervimycine C, un antibiotique sécrété par *Streptomyces tendae* son compétiteur naturel dans le même biotope. De plus, ce transporteur est capable de fixer et de transporter une grande variété de molécules dont de nombreux antibiotiques en adoptant à la fois une conformation prenant en charge le ligand (IF, conformation ouverte vers l'intérieur de la cellule), et une conformation ouverte vers l'extérieur de la cellule (OF) pour le relarguer. Cette capacité de manipuler plusieurs molécules reste une question très discutée, surtout dans la compréhension du mécanisme de transport au niveau moléculaire. Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude d'enzymologie structurale sur un mutant inactif E504A de BmrA en présence de ligands (Rhodamine 6G et Hoechst 33342) afin d'améliorer les connaissances sur ce mécanisme. Ces ligands jouent un rôle d'effecteur allostérique sur la fixation d'ATP de BmrA, impactant la transition entre les conformations IF et OF. La résolution de plusieurs structures 3D par cryoEM a été réalisée en variant la concentration d'ATP. Une analyse de la flexibilité de chacune de ces conformations a mis en lumière les réarrangements moléculaires que BmrA peut adopter pour assurer sa polyspécificité. De plus, j'ai apporté de nombreuses informations fonctionnelles en ce qui concerne le couplage entre le transport du ligand et l'activité ATPasique de ce transporteur.

La deuxième partie de mes travaux concerne l'étude de la transition conformationnelle se produisant chez BmrA après la fixation d'ATP à l'aide de techniques dites « en temps résolu ». L'objectif a été de suivre ces changements conformationnels au cours du temps grâce à la fluorescence intrinsèque de BmrA couplée à la cryoEM. J'ai développé et optimisé les conditions expérimentales pour réaliser cette étude, et notamment acquis des informations cinétiques et dynamiques sur des mutants ainsi que la protéine sauvage.

Enfin, la dernière partie du manuscrit se rapporte sur l'étude de BmrA dans un environnement amphipathique plus natif afin d'acquérir sa structure 3D par cryoEM. J'ai optimisé ce protocole de reconstitution pour obtenir le meilleur échantillon possible à déposer sur grille. Au cours de ce processus, j'ai caractérisé la formation du protéoliposome à chaque étape du protocole en l'observant par cryoEM. Grâce à cette étude, j'ai pu obtenir les premières classes 2D de BmrA en bicouche lipidique.

En conclusion, cette thèse offre une nouvelle façon d'étudier la relation structure-fonction des protéines en développant des outils et une méthodologie d'enzymologie structurale pour visualiser la dynamique de ce transporteur ABC, ainsi qu'une première approche pour l'étudier en liposome.

Table des matières

RESUME DE LA THESE	3
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	10
ABREVIATIONS	11
1 CONTEXTE GENERAL	13
1.1 LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	13
1.2 LES POMPES A EFFLUX	18
1.3 LES TRANSPORTEURS ABC.....	21
1.3.1 <i>Topologie</i> :.....	23
1.3.2 <i>Domaines nucléotidiques et transmembranaires</i>	23
1.3.3 <i>Mécanisme des exportateurs de type IV</i>	25
1.4 LA CRYOEM, UN OUTIL POUR L'ETUDE CONFORMATIONNELLE DES TRANSPORTEURS ABC	31
1.4.1 <i>La microscopie électronique en quelques mots</i>	31
1.4.2 <i>De la préparation d'échantillon aux traitements de données cryoEM</i>	32
1.4.3 Publication 1 : <i>L'étude des protéines membranaires par cryoEM</i>	37
1.5 LES CONNAISSANCES MECANISTIQUES SUR BMRA.....	51
2 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE MA THESE	58
3 PARTIE 1 : ETUDE MECANISTIQUE DE BMRA EN ETAT STATIONNAIRE	60
3.1 MISE EN CONTEXTE	60
3.2 POINTS MAJEURS DES ARTICLES	61
3.3 CONCLUSIONS.....	69
3.4 PUBLICATION 2 : R6G NARROWS BMRA CONFORMATIONAL SPECTRUM FOR A MORE EFFICIENT USE OF ATP	72
3.5 PUBLICATION 3 : "CONFORMATIONAL SPACE EXPLORATION OF CRYO-EM STRUCTURES BY VARIABILITY REFINEMENT"	120
4 PARTIE 2 : ETUDE MECANISTIQUE DE BMRA EN TEMPS RESOLU	128
4.1 L'ECHELLE DE TEMPS AU SEIN DES PROTEINES	128
4.2 LA CRYOEM EN TEMPS RESOLU	134
4.2.1 <i>Les principes</i>	135
4.2.2 <i>Les méthodes employées par cryoEM en temps résolu</i>	141
4.2.3 <i>Limites et challenges de la cryoEM en temps résolu</i>	147
4.3 ASPECTS DYNAMIQUES CHEZ LES EXPORTATEURS DE TYPE IV	149
4.4 DONNEES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES SUR BMRA EN TEMPS RESOLU	151
4.4.1 <i>Caractérisation biochimique de BmrA par fluorescence</i>	151
4.4.2 <i>Acquisition de données de cinétiques sur BmrA par stopped-flow</i>	159
4.4.3 <i>Recherche d'un modèle enzymologique</i>	166

4.4.4	<i>Acquisition et analyse des données structurales par cryoEM en temps résolu ...</i>	170
4.5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	178
5	PARTIE 3 : ACQUISITION DE LA STRUCTURE DE BMRA DANS UN ENVIRONNEMENT NATIF	182
5.1	INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT AMPHIPATHIQUE CHEZ LES TRANSPORTEURS ABC	182
5.1.1	<i>L'environnement amphipathique des protéines membranaires</i>	<i>182</i>
5.1.2	<i>Impact fonctionnel et structural de l'environnement amphipathique sur les transporteurs ABC</i>	<i>187</i>
5.2	RECONSTITUTION DE BmRA EN LIPOSOME NON PREFORME ET ANALYSE STRUCTURALE DES LIPOSOMES	189
5.2.1	<i>Reconstitution de BmrA en liposome non préformé.....</i>	<i>189</i>
5.2.2	<i>Acquisition des images cryoEM des liposomes.....</i>	<i>190</i>
5.3	RECONSTITUTION DE BmRA A PARTIR DE LIPOSOME PREFORME ET ANALYSE STRUCTURALE PAR CRYOEM	191
5.3.1	<i>Nouveau protocole de reconstitution de BmrA en liposome.....</i>	<i>191</i>
5.3.2	<i>Observations des liposomes par cryoEM pour chaque étape du protocole</i>	<i>194</i>
5.3.3	<i>Acquisition des données cryoEM préliminaires.....</i>	<i>199</i>
5.4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	200
6	CONCLUSION GENERALE	202
7	MATERIELS ET METHODES	205
7.1	EXPRESSION DE BMRA	205
7.2	PURIFICATION	206
7.3	RECONSTITUTION EN LIPOSOME.....	207
7.4	TESTS FONCTIONNELS.....	207
7.5	ETUDE STRUCTURALE PAR CRYOEM : PREPARATION DES GRILLES.....	209
8	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	210

Table des figures

Figure 1 : La résistance aux antibiotiques à l'échelle de la planète.....	13
Figure 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en place par les bactéries.....	15
Figure 3 : Représentation des différentes familles de pompes à efflux bactériens.	18
Figure 4 : Vue d'ensemble de la topologie et des structures des différentes classes de transporteur ABC.	22
Figure 5 : Les motifs conservés dans les NBDs.....	24
Figure 6 : Principe du mécanisme d'accès alterné décrit par Jadertzsky en 1966 pour les transporteurs.	25
Figure 7 : Mécanisme réactionnel d'hydrolyse d'ATP (catalyse générale de base).	27
Figure 8 : Deux modèles possibles pour le cycle catalytique au niveau des NBDs.....	27
Figure 9 : Comparaison des volumes de la cavité fixant le substrat entre plusieurs structures du transporteurs NaAtm1.	29
Figure 10 : Visualisation de la mobilité des hélices TM1-2 dans la conformation OF chez les exportateurs.	30
Figure 11 : Evolution de la résolution des structures obtenues par cryoEM de 2013 à aujourd'hui.....	32
Figure 12 : Les différentes étapes pour la résolution d'une structure 3D par cryoEM.....	32
Figure 13 : Les étapes de dépôt, de blotting, et de freezing de l'échantillon sur une grille cryoEM.....	34
Figure 14 : Fonctionnement d'un microscope électronique à transmission.	35
Figure 15 : Pipeline pour la résolution de structure 3D cryoEM à l'aide de cryoSPARC.	36
Figure 16 : Micrographes et modèles 3D des roulettes de BmrA en conformation IF avec différentes ouvertures des NBDs.....	54
Figure 17 : Structures 3D résolues de BmrA	55
Figure 18 : Les modèles mécanistiques proposés sur l'efflux de substrat et le fonctionnement des NBDs chez BmrA	57
Figure 19 : Fixation de l'ATP sur BmrA en absence ou en présence de R6G et les structures 3D des différentes conformations IF/OF.....	62
Figure 20 : Superposition des structures en conformation IF ou OF en absence ou en présence de R6G.....	63
Figure 21 : Variabilité 3D de BmrA-E504A sous forme apo ou en présence de R6G	65
Figure 22 : Schéma de traitement des données du jeu BmrA-E504A en complexe avec le hœchst 33342.....	66
Figure 23 : Variabilité 3D de BmrA-E504A en complexe avec le hœchst 33342	67
Figure 24 : Mesures de l'activité ATPase et du transport.....	68
Figure 25 : Modèle de la plasticité de BmrA en absence ou en présence de ligand	69
Figure 26 : Échelle temporelle et spatiale au sein des protéines.....	129
Figure 27 : Description du photocycle de la bactériorhodopsine à pH 6, avec les différentes durées de vie des intermédiaires.....	130
Figure 28 : Représentation du paysage énergétique d'une protéine, décrite par un aspect thermodynamique et les durées de vie des intermédiaires des conformations A et B.	131
Figure 29: Vue d'ensemble des différentes techniques pour acquérir des informations temporelles et structurales sur le mécanisme des protéines.	132

Figure 30 : Modèle proposé pour le processus de recyclage du ribosome.....	136
Figure 31 : Vue d'ensemble des échelles de temps accessibles avec les différentes techniques de cryoEM en temps résolu.....	138
Figure 32 : Structures des différents états de contraction du CCMV et l'analyse de la variabilité entre les particules de ces états.....	139
Figure 33 : Reconstruction du paysage conformationnel du complexe de poly-ubiquitination APC/C à l'aide du logiciel cryoDRGN.....	140
Figure 34 : Vue d'ensemble des approches par cryoEM en temps résolu avec les gammes de temps associées.	141
Figure 35 : Chronologie relative des événements de l'activation de la protéine G à la suite d'un échange de nucléotides initiées par une GPCR.....	142
Figure 36 : Système de puce microfluidique.....	144
Figure 37 : Système C-SPAM.....	145
Figure 38 : Système de réchauffement et re-vitrification rapide sur grille à l'aide d'un laser	146
Figure 39 : Localisation des résidus de tryptophane au niveau d'un monomère (vert foncé) du mutant inactif E504A.	151
Figure 40 : Procédure de suivi de la fluorescence intrinsèque de BmrA au cours du temps.	152
Figure 41 : Les contrôles sur la fluorescence intrinsèque du mutant E504A en DDM-cholate.	155
Figure 42 : Comparaison du profil cinétique entre les mutants inactifs E504A et E504Q. ...	156
Figure 43 : Comparaison des profils cinétiques entre les mutants inactifs (E504A, E504Q) et la protéine sauvage.	157
Figure 44 : Tests de la température et de la concentration d'ATP.	158
Figure 45 : Schéma du fonctionnement d'une machine de stopped-flow.....	159
Figure 46 : Effet de filtre interne à des fortes concentrations d'ATP.....	160
Figure 47 : Cinétiques des mutants E504A, E504Q, et la protéine sauvage (WT) avec une gamme de concentrations d'ATP.	161
Figure 48 : Détermination des paramètres mécanistiques à partir des cinétiques de BmrA-E504A en fonction des concentrations d'ATP.	162
Figure 49 : Détermination des paramètres mécanistiques à partir des cinétiques de BmrA-E504Q en fonction des concentrations d'ATP à partir d'une fonction mono-exponentielle.	163
Figure 50 : Détermination des paramètres mécanistiques à partir des cinétiques de BmrA-E504Q en fonction des concentrations d'ATP à partir d'une fonction double exponentielle.	163
Figure 51 : Détermination des paramètres mécanistiques à partir des cinétiques de BmrA-WT en fonction des concentrations d'ATP à partir d'une fonction mono- et double exponentielle.	164
Figure 52 : Proposition d'un modèle enzymatique pour BmrA.	166
Figure 53 : Procédure pour analyser les données de cinétiques pour déterminer un modèle enzymatique.	166
Figure 54 : Modèles enzymatiques des mutants (E504A, E504Q) et de la protéine sauvage à partir des données cinétiques.....	169
Figure 55 : Dispositif mise en place pour la cryoEM en temps résolu.	170
Figure 56 : Traitement des données de la collecte du mutant E504A à 12 s.....	171
Figure 57 : Traitement des données de la collecte du mutant E504A à 20 s.....	172

Figure 58 : Traitement des données de la collecte du mutant E504A à 40 s.....	173
Figure 59 : Classification 3D et structures 3D de BmrA de deux intermédiaires conformationnels de la conformation IF à partir du jeu 12s.	175
Figure 60 : Cartes issues du 3DVA pour la composante 0 du jeu E504A-12s.....	176
Figure 61 : Corrélation entre la fluorescence et les données cryoEM sur la transition de la conformation IF vers la conformation OF du mutant E504A en présence de R6G et d'ATP.	177
Figure 62 : Proportion des espèces en concentration (μM) au cours du temps.....	180
Figure 63 : Différents outils employés pour étudier les protéines membranaires.....	183
Figure 64 : Différents types possibles de liposomes.	185
Figure 65 : Structure 3D de MsbA résolues dans 12 environnements amphipathiques différents par cryoEM.	187
Figure 66 : Premier protocole de reconstitution de BmrA en liposome.....	189
Figure 67 : Observation des liposomes contenant BmrA par cryoEM dans deux conditions de préparation.....	190
Figure 68 : Protocole de reconstitution à partir de liposome préformé.....	192
Figure 69 : Deuxième protocole de reconstitution de BmrA en liposome.	193
Figure 70 : Courbe de déstabilisation des liposomes par des concentrations croissantes de Triton X-100.....	193
Figure 71 : Images des liposomes après la sonication.	194
Figure 72 : Images des liposomes après les étapes de congélation-décongélation et d'extrusion.	195
Figure 73 : Images des liposomes entre R _{sat} et R _{sol}	196
Figure 74 : Images des liposomes après deux conditions d'incubations avec les Biobeads (RT, 4 °C).	197
Figure 75 : Images des liposomes en présence de BmrA-E504A en présence d'ATP (5 mM).	198
Figure 76 : Début de la stratégie de traitement des données cryoEM.....	199
Figure 77 : Système d'enzymes couplées pour la mesure d'activité ATPasique de BmrA. ..	208

Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau réunissant les constantes d'affinité de BmrA en détergent (DDM) pour plusieurs substrats à l'aide de sa fluorescence intrinsèque.	53
Tableau 2 : Durée de vie moyenne des conformations IF et OF pour MRP1 sauvage et le mutant E1454Q en présence ou en absence de LTC4, d'après les données smFRET.	149
Tableau 3 : Tableau 3 : Constantes de temps obtenus après le fitting des données de SAXS en temps résolu.....	150
Tableau 4 : Accessibilité des résidus tryptophane au solvant du mutant E504A.....	153
Tableau 5 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-E504A.....	167
Tableau 6 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-E504Q.....	168
Tableau 7 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-WT.....	168
Tableau 8 : Pourcentages des conformations IF et OF sélectionnées sur les grilles en fonction du temps.	174
Tableau 9 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des environnements amphipathiques.	184

ABREVIATIONS

3DVA : **3D** variability **analysis**

ABC : **ATP-binding cassette**

ADP : **Adénosine diphosphate**

AMP-PNP : **Adénylyl imidodiphosphate**

ARNm : **Acide ribonucléique messenger**

ATP : **Adénosine triphosphate**

BmrA : *Bacillus subtilis* **multidrug resistance ATP**

CARD : **Comprehensive antibiotic resistance database**

CH : **Coupling helix**

CMC : **Concentration micellaire critique**

CryoEM : **Cryo-electron microscopy**

C-SPAM : **Cryo-EM sample preparation with light-activated molecules**

DDM : **Dodecyl beta-maltoside**

EH : **Elbow helix**

FSC : **Fourier shell correlation**

GLASS : **Global antimicrobial resistance and use surveillance system**

H33342 : **Hœchst 33342**

HDX-MS : **Hydrogen deuterium exchange mass spectrometry**

HEPES : **4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid**

IF : **Inward-facing**

LPS : **Lipopolysaccharide**

LUV: **Large unilamellar liposome**

MDR : **Multidrug resistance**

MFP : **Membrane fusion protein**

NATA : **N-acétyl tryptophanamide**

NBD : **Nucleotide-binding domain**

NBS : **Nucleotide-binding site**

OF : **Outward-facing**

OMF : **Outer membrane factor**

OMS : **O**rganisation **m**ondiale de la santé

PBP : **P**enicillin-**b**inding **p**rotein

PDB : **P**rotein **d**ata **b**ank

P_i : **P**hosphate **i**norganique

R6G : **R**hodamine **6G**

RMN : **R**ésonance **m**agnétique **n**ucléaire

RT : **R**oom **t**emperature

SANS : **S**mall **a**ngle **n**eutron **s**cattering

SBP : **S**ubstrate-**b**inding **p**rotein

smFRET : **S**ingle **m**olecule **f**luorescence **r**esonance **e**nergy **t**ransfert

SUV : **S**mall **u**nilamellar **l**iposome

TMD : **T**rans**m**embrane **d**omain

TMH : **T**rans**m**embrane **h**elix

WT : **W**ild **t**ype

1 Contexte général

1.1 La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un sujet assez discret, en comparaison aux pandémies virales comme le Covid-19, fortement médiatisées. Pourtant, le nombre de morts associé à des infections de pathogènes résistants aux antibiotiques s'élevait à 1,27 millions de morts en 2019 (O'Neill 2016; Murray et al. 2022). Ce phénomène est pris très au sérieux par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et de nombreux plans d'action ont été proposés durant les réunions du G20 (Berlin Declaration of the G20 Health Ministers). Ce nombre n'a cessé d'augmenter depuis et il pourrait atteindre les 10 millions en 2050 d'après les estimations (O'Neill 2016; Murray et al. 2022).

La lutte contre ces bactéries multirésistantes nous touche de près. En effet, notre utilisation inappropriée et excessive des antibiotiques contribue en partie à l'apparition et la propagation de résistance chez les bactéries. Ces causes sont à mettre en lien avec les interconnexions qui existent entre l'homme et son environnement notamment dans le domaine de l'agroalimentaire (Figure 1). La production de nourriture amène souvent à une utilisation massive d'antibiotiques dans l'élevage pour prévenir les maladies dans certains pays, ce qui peut avoir comme conséquence la transmission de pathogènes résistants entre l'animal et l'homme dans la chaîne alimentaire (Graham et al. 2019; Tiseo et al. 2020). D'autres conséquences sont à craindre, concernant notamment l'incapacité de la médecine moderne à traiter ces infections avec des hospitalisations plus longues, des coûts plus importants et donc un risque de mortalité accrue (Dadgostar 2019).

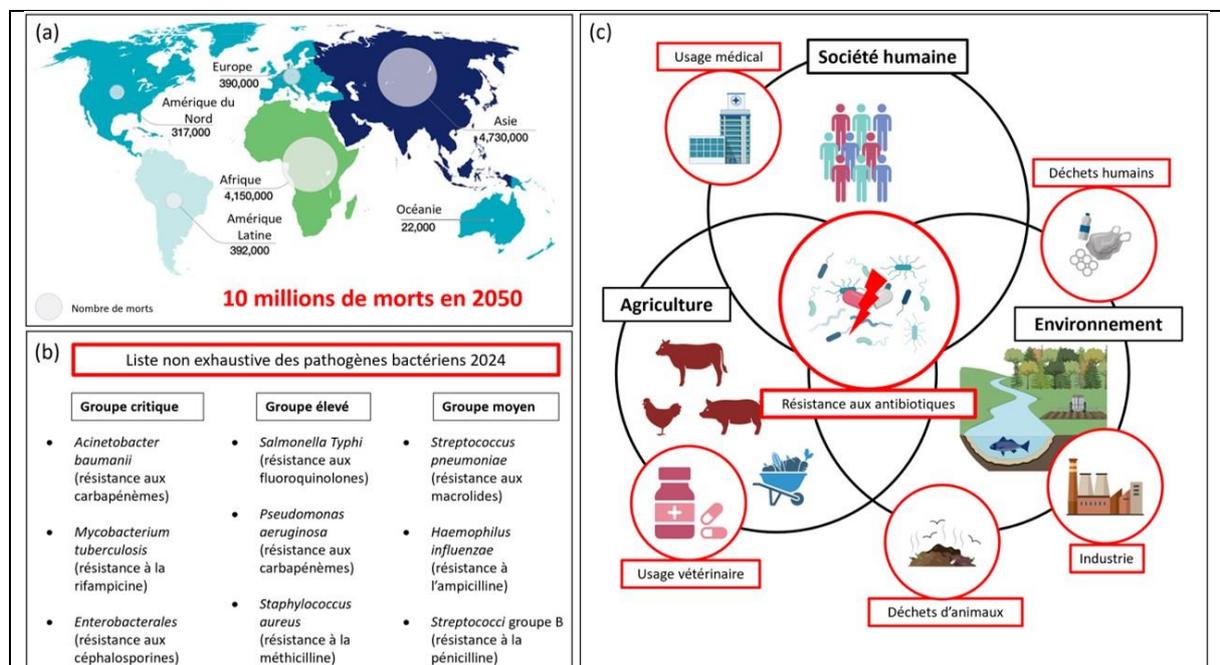


Figure 1 : La résistance aux antibiotiques à l'échelle de la planète.

(a) Estimation pour 2050 des morts causés par la résistance aux antibiotiques pour chaque continent. Les pays en voie de développement sont les plus touchés comparés aux pays occidentaux (Schéma adapté de (Murray et al. 2022; O'Neill 2016)). (b) Liste des agents pathogènes prioritaires pour 2024 émise par l'OMS, avec quelques exemples pour chaque groupe. Cette liste comprend 15 familles de

bactéries avec un niveau de résistance aux antibiotiques classés en trois groupes, critique, élevé et moyen. Ceci donne une direction sur les nouveaux traitements nécessaires pour stopper la propagation de ces résistances (tableau adapté de (WHO bacterial priority pathogens list, 2024 s. d.). (c) Diagramme de Venn montrant les liens entre les différentes interfaces humaines, animales et environnementales impliquées dans les processus de propagation des résistances. Par exemple, des pathogènes peuvent être transmis chez l'homme par le contact direct avec les animaux ou par l'ingestion d'aliments contaminés. De plus, l'environnement a un rôle de réservoir et de diffusion de bactéries résistantes. (schéma adapté de (Dadgostar 2019; Graham et al. 2019; Tiseo et al. 2020)).

Plusieurs actions préventives ont été mises en place à travers le monde et notamment en France dont on se souvient de l'adage : « les antibiotiques, ce n'est pas automatique », mais ceci est vite contrasté par certains comportements. Par exemple, une forte utilisation d'antibiotiques a été recensé par GLASS (« Global antimicrobial resistance and use surveillance system ») chez des patients hospitalisés pendant la pandémie de Covid-19, qui fait craindre l'émergence de superbactéries (Tomczyk et al. 2021). L'OMS a déjà établi une liste, mise à jour récemment, classifiant 15 familles de pathogènes résistants aux antibiotiques (WHO bacterial priority pathogens list, 2024 s. d.) pour informer le monde de la recherche et le domaine de la santé publique. L'objectif est de mieux comprendre le fonctionnement de ces bactéries afin de trouver de nouvelles classes d'antibiotiques ou agent thérapeutiques pour combattre efficacement ces infections.

Afin de mieux combattre les pathogènes résistants à un ou plusieurs antibiotiques, il est capital de connaître et comprendre les mécanismes développés par ces bactéries. Elles peuvent soit avoir une résistance intrinsèque à la suite de mutation aléatoire ou une résistance acquise dues à une pression de sélection ou par transfert horizontal de gènes. Plusieurs bases de données sur la résistance aux antibiotiques existent dont la plus connue est CARD (« Comprehensive antibiotic resistance database ») (Alcock et al. 2023). Elle permet d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques, les mutations ou encore les mécanismes associés.

Au niveau moléculaire, il existe plusieurs mécanismes de résistance qui sont mis en place par les bactéries pour échapper aux thérapies (Figure 2).

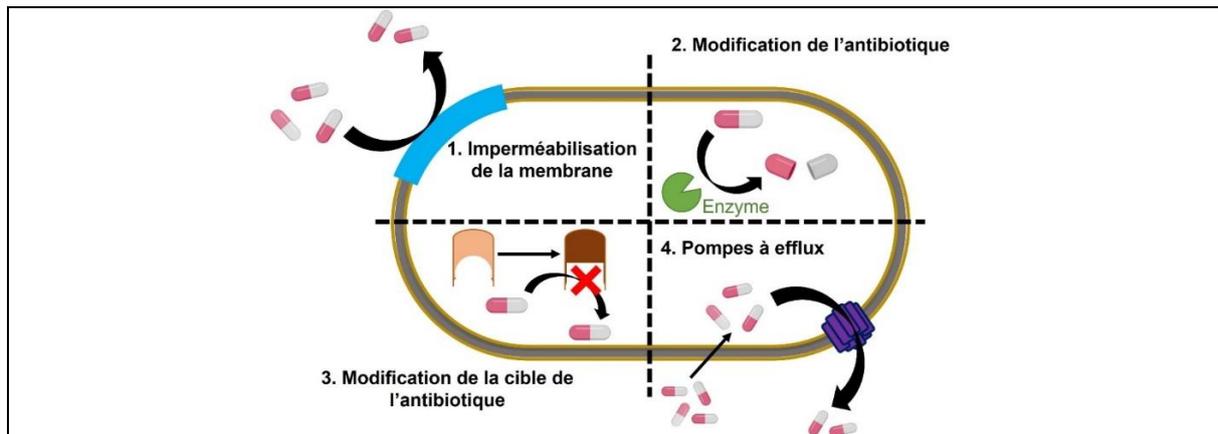


Figure 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en place par les bactéries.

L'acquisition d'un de ces mécanismes de défense peut être dû soit à la mutation d'un gène, soit à l'acquisition d'un plasmide contenant un gène de résistance à un ou plusieurs antibiotiques par transfert horizontal de gènes. Ces mécanismes peuvent se combiner pour une meilleure efficacité de résistance (Schéma adapté de (Darby et al. 2023)).

- Imperméabilisation de la membrane :

La première ligne de défense de la bactérie est sa membrane. Elle peut en modifier la composition pour moduler sa perméabilité, rendant plus difficile la pénétration des antibiotiques. Les bactéries à Gram négatif ont une forte imperméabilité intrinsèque en raison de leur double membrane mais de nombreux composés dont des antibiotiques peuvent toutefois transiter par des porines enchâssées dans ces membranes. Ainsi, l'altération de ces porines représente un bon moyen de résistance aux antibiotiques, par exemple, la perte de porine OrpD chez *Pseudomonas aeruginosa* empêche l'entrée des carbapénèmes (Chevalier et al. 2017). Si les bactéries à Gram négatif sont moins perméables aux antibiotiques que celles à Gram positif du fait de leur double membrane, une bactérie à Gram positif telle que *Mycobacteria* peut créer une membrane externe supplémentaire avec une capsule polysaccharidique afin de prévenir l'entrée des antibiotiques (Draper 1998). Enfin, il a été aussi rapporté que le changement de la composition phospholipidique de la membrane plasmique peut affecter sa fluidité et donc l'entrée de certains antibiotiques. C'est le cas pour *Enterococcal* qui développe une résistance à la daptomycine (Mishra et al. 2012).

- Modification de l'antibiotique :

La modification ou l'inactivation des antibiotiques permet à la bactérie de les empêcher d'agir. Ceci est généralement réalisé par l'action d'enzymes capable de dégrader ou encore modifier l'antibiotique. Par exemple, les β -lactamases catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame le rendant inutile (Tooke et al. 2019). Le spectre d'action de ces enzymes peuvent s'élargir à d'autres molécules de type pénicilline, céphalosporine, carbapénème et monobactame comme chez *Klebsiella pneumoniae*, impliqué dans des infections nosocomiales

(Nepal et al. 2017). De plus, des enzymes peuvent modifier chimiquement certains antibiotiques pour diminuer l'affinité pour leurs cibles les rendant ainsi inefficaces. C'est le cas de l'apramycine, un antibiotique couramment utilisé contre les pathogènes résistants aux aminoglycosides, qui peut être modifié par l'acétyltransférase, ApmA (Bordeleau et al. 2021).

- Modification de la cible :

Un antibiotique se fixe sur une cible bien précise avec une forte affinité et inhibe une fonction cellulaire essentielle, soit en empêchant la croissance de la bactérie, ou en provoquant sa mort. Cette cible peut être altérée de façon différente pour perturber la fixation de l'antibiotique. La première modification possible est une mutation dans le site actif de la cible. Par exemple, il a été montré que des mutations dans le site actif des protéines fixant la pénicilline (Penicillin-binding proteins, PBPs) confèrent une résistance aux β -lactames chez *Salmonella enterica* (Sun, Selmer, et Andersson 2014). La deuxième possibilité est la protection de la cible par modifications post-traductionnelles, pour encombrer de façon stérique le site de fixation. Un exemple concret est la méthylation de l'ARN ribosomique 16S qui empêche la fixation des aminoglycosides (Doi, Wachino, et Arakawa 2016). Une autre façon de protéger la cible, sans empêcher la liaison à l'antibiotique mais pour en atténuer l'effet, reste l'utilisation d'une autre protéine partenaire. C'est le cas chez *Staphylococcus aureus* résistant à l'acide fusidique qui exprime des protéines FusB. L'acide fusidique inhibe la traduction en se liant aux facteurs d'élongation G (EF-G). Ainsi, FusB favorise la dissociation de ce complexe (Cox et al. 2012). Enfin, un autre mécanisme pour permettre à la bactérie d'éviter l'action de l'antibiotique est de contourner la cible pour une autre. *S. aureus*, par exemple, augmente le niveau de synthèse d'une PBP exogène (PBP2a) homologue à la cible d'origine, diminuant ainsi les chances de la méthicilline de se fixer sur la bonne cible (Stapleton et Taylor 2002).

- Efflux de l'antibiotique :

L'efflux d'antibiotique est une autre barrière pour prévenir la résidence d'antibiotiques à l'intérieur de la cellule bactérienne, en les expulsant. Ces pompes possèdent un rôle assez important dans l'émergence de la résistance à de multiples médicaments chez les bactéries. En effet, ces protéines transmembranaires ont la capacité de transporter des composés chimiquement différents. Une brève description de l'ensemble de ces pompes sera présentée dans le paragraphe suivant. De plus, ces transporteurs sont exprimés de façon constitutive mais ils peuvent être surexprimés en réponse à l'antibiotique. C'est pourquoi, leur production est fortement régulée par plusieurs systèmes comme des activateurs ou répresseurs transcriptionnels (Deng, Li, et Xie 2013) ainsi que des systèmes à deux composants (De Gaetano et al. 2023).

Ces pompes sont un moyen pour la bactérie d'interagir avec son environnement et surtout survivre dans des niches écologiques (Blanco et al. 2016). En effet, la présence de ces systèmes favorise la sélection naturelle des bactéries résistantes, soumis à l'exposition d'antibiotiques. Ainsi, la survie à de faibles niveaux de drogues leur offre le temps de développer un ou des mécanismes de résistance plus spécifiques. Cette activité d'efflux devient alors une « plateforme » primordiale (Nazarov 2022) qui permet à de nombreux pathogènes de devenir

super ou multi-résistants à de nombreuses classes d'antibiotiques en combinant plusieurs mécanismes de résistance.

Les bactéries développent des moyens pour résister à notre consommation abusive d'antibiotiques. La conséquence est la réduction du champ thérapeutique pour traiter ces infections en raison du nombre limité de classes d'antibiotiques efficaces et disponibles. Dans cette course contre la montre, de nouvelles classes d'antibiotiques (Zampaloni et al. 2024) et d'approches thérapeutiques émergent (Brives et Pourraz 2020), afin d'éviter une ère post-antibiotique dans le futur. Finalement, la compréhension de ces résistances au niveau moléculaire reste un bon moyen de développer ces nouvelles stratégies pour combattre ces pathogènes.

Ma thèse va porter sur la compréhension du mécanisme d'un transporteur ABC, une pompe à efflux exprimée par *Bacillus subtilis* sous l'acronyme BmrA.

1.2 Les pompes à efflux

Les pompes à efflux se retrouvent chez la plupart des microorganismes, les plantes et l'Homme (Gbelska, Krijger, et Breunig 2006; Kartner, Riordan, et Ling 1983; Saier et al. 1998; Wanke et Kolukisaoglu 2010). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme la protection de l'organisme contre des toxiques environnementaux, l'import de nutriment ou bien l'homéostasie cellulaire (Gaurav et al. 2023). Ces pompes à efflux peuvent être regroupées en 7 familles (RND, MFS, MATE, SMR, PACE, AbgT, ABC), classées en fonction de la source d'énergie utilisée pour le transport de substrat. Il y a celles qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, dénommées « pompe à efflux primaire », et celles qui utilisent des gradients électrochimiques formés par des protons ou des ions, ce sont les « pompes à efflux secondaires ». La figure 3 représente ces différentes familles avec un exemple de structure.

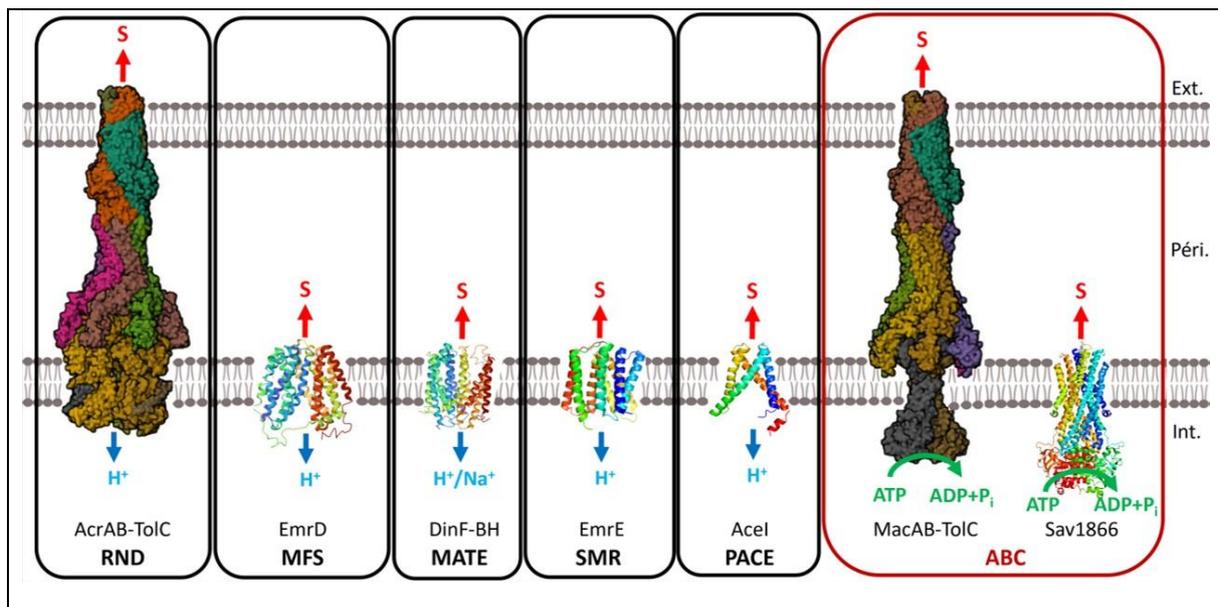


Figure 3 : Représentation des différentes familles de pompes à efflux bactériens.

Un membre de chaque famille est représenté par sa structure récupérée dans la base de données des protéines (PDB). De gauche à droite, il y a : AcrAB-TolC (5V5S), EmrD (2GFP), DinF-BH (4LZ6), EmrE (8UWU), AceI (AlphaFold), MacAB-TolC (5NIL), Sav1866 (2HYD). (Ext. : côté extracellulaire, Péri. : espace périplasmique, Int. : côté intracellulaire de la bactérie, S : substrat) (Schéma adapté de (Nazarov 2022)).

- RND (Resistance Nodulation cell Division) :

Cette superfamille de transporteurs est présente majoritairement chez les bactéries à Gram négatif. Cette pompe fonctionne selon un assemblage tripartite composé d'un canal membranaire externe (OMF) qui expulse le substrat, d'une protéine membranaire dans la membrane interne avec 12 hélices α transmembranaires permettant le mouvement des protons et le passage de la drogue (RND), et d'une protéine adaptatrice qui fait le lien entre le canal externe et le transporteur (MFP). Ces pompes fonctionnent grâce à la force proton-motrice. Cet assemblage tripartite est le plus grand comparé aux autres familles et produit une résistance plus efficace en combinaison avec la membrane externe. Le premier membre de cette famille décrit en 1993 est AcrB exprimé par *Escherichia coli* (Ma et al. 1993). L'assemblage tripartite est composé d'AcrA comme MFP et TolC comme OMF. De plus, ce système transporte une

grande variété de substrat, notamment des β -lactames, chloramphénicol, tétracyclines ou encore l'acriflavine (Nishino et al. 2003; Okusu, Ma, et Nikaido 1996; Salehi et al. 2021).

- MFS (Major Facilitator Superfamily) :

La famille MFS est divisée en plusieurs groupes selon le couplage du transport et l'utilisation du gradient électrochimique (Marger et Saier 1993; Pao, Paulsen, et Saier 1998). Ainsi, il y a :

- Les uniporteurs, ayant un transport de substrat sous l'action d'un gradient de concentration.
- Les symporteurs, utilisant un cotransport entre le substrat et l'ion dans la même direction.
- Les antiporteurs, utilisant un cotransport entre le substrat et l'ion dans des directions opposées.

Ces transporteurs possèdent généralement 12 à 14 hélices α transmembranaires. Ils utilisent un mécanisme d'accès alterné en adoptant deux types de conformations (une conformation ouverte vers l'intérieur, IF, et une conformation ouverte vers l'extérieur, OF) pour transporter le substrat à travers la membrane. La caractérisation de ce mécanisme a été très étudiée, notamment sur la lactose perméase, LacY, un symporteur utilisant le gradient de proton, qui est l'archétype des MFS (Jiang et al. 2020).

- MATE (Multiple Antibiotic and Toxin Extrusion) :

Les membres de cette famille sont présents chez les bactéries à Gram négatif. Ils sont très hétérogènes en ce qui concerne la taille et le nombre d'hélices α transmembranaires (Kuroda et Tsuchiya 2009; Kusakizako et al. 2020). Ces transporteurs utilisent surtout un gradient de proton ou de sodium pour conduire l'efflux de composés cationiques ou poly-aromatiques (Omote et al. 2006). NorM, par exemple, est un antiporteur substrat/ Na^+ qui confère la résistance à la norfloxacine ou encore à la kanamycine chez *Vibrio parahaemolyticus* (Morita et al. 1998). Cette protéine contient 12 hélices α transmembranaire assez proche de la famille MFS d'un point de vue structural mais ne partageant aucune homologie de séquence.

- SMR (Small Multidrug Resistance) :

De nombreuses petites protéines d'une centaine d'acides aminés composent cette famille. Elles possèdent 4 hélices α transmembranaires sous forme de dimère ou hétérodimère (Burata et al. 2022; Rapp et al. 2006). Ces pompes peuvent être classifiées en fonction de leurs substrats transportés qui sont principalement des cations lipophiles, comme les composés ammonium quaternaire (Hagit Yerushalmi, Lebendiker, et Schuldiner 1995). Un exemple de membre de cette famille est EmrE exprimé chez *E. coli* qui est un dimère asymétrique (Ubarretxena-Belandia et al. 2003) où chaque monomère est arrangé de façon antiparallèle. La protonation du résidu glutamate 14 dans l'hélice transmembranaire n° 1 permet de moduler les conformations adoptées (IF et OF) de façon allostérique (Gayen, Leninger, et Traaseth 2016; Muth et Schuldiner 2000).

- PACE (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux) :

Les membres de cette famille partagent de nombreux points en commun avec la famille SMR, comme la taille et les structures secondaires. C'est le cas d'AceI (Acinetobacter chlorhexidine efflux protein) qui a été décrite comme appartenant à la famille SMR, en raison de la conservation de la fonction du résidu E14 dans le TMH1. Cependant, il existe une faible homologie de séquence (Bolla et al. 2020; Hassan et al. 2019; H. Yerushalmi et Schuldiner 2000). De plus, les pompes de type PACE contribuent à la résistance contre des agents bactéricides synthétiques comme la chlorhexidine, l'acriflavine, la proflavine et le benzalkonium, en utilisant l'énergie de la force proton-motrice (Hassan et al. 2015, 2018). Enfin, il n'existe aucune structure 3D résolue à ce jour mais il est possible d'avoir une idée en la prédisant par AlphaFold (Figure 3).

- AbgT (p-Aminobenzoyl-glutamate Transporter) :

La découverte de ce type de pompe à efflux est très récente. C'est pourquoi, il existe peu de données structurales et fonctionnelles. Ils sont décrits comme des importateurs de p-aminobenzoyl-glutamate pour la biosynthèse d'acide folique bactérien (Carter et al. 2007; Delmar et Yu 2016). Les structures de YdaH, exprimé par *Alcanivorax borkumensis*, et MtrF, exprimé par *Neisseria gonorrhoeae*, ont été résolus par cristallographie aux rayons X et montre une architecture très distincte des autres familles sous forme de dimère (Bolla et al. 2015; Su et al. 2015). Elles possèdent 9 hélices α transmembranaires et les données biochimiques suggèrent qu'elles pourraient conférer une résistance contre les sulfonamides (Delmar et Yu 2016).

- Transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) :

Cette dernière famille est la seule classe à utiliser l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour le transport de substrat. Cette superfamille est ubiquitaire et se retrouve dans toutes les branches de la vie, c'est-à-dire chez les bactéries, les archées et les eucaryotes (C. F. Higgins 1992; Holland et al. 2003). Ces pompes sont capables d'importer ou exporter une grande variété de composés chimiques sans aucun lien physico-chimique comme des ions, des métaux, des sucres, des acides aminés, des lipides, ou encore des xénobiotiques (Berntsson et al. 2010; Tarling, de Aguiar Vallim, et Edwards 2013; Yu et al. 2015). On peut retrouver soit un transporteur ABC comme Sav1866 dans la membrane interne de *S. aureus* (Velamakanni et al. 2008) ou alors dans un système tripartite dont c'est le cas pour MacAB-TolC chez *E. coli* (Kobayashi, Nishino, et Yamaguchi 2001). Une description plus exhaustive sera faite sur cette famille dans le paragraphe suivant.

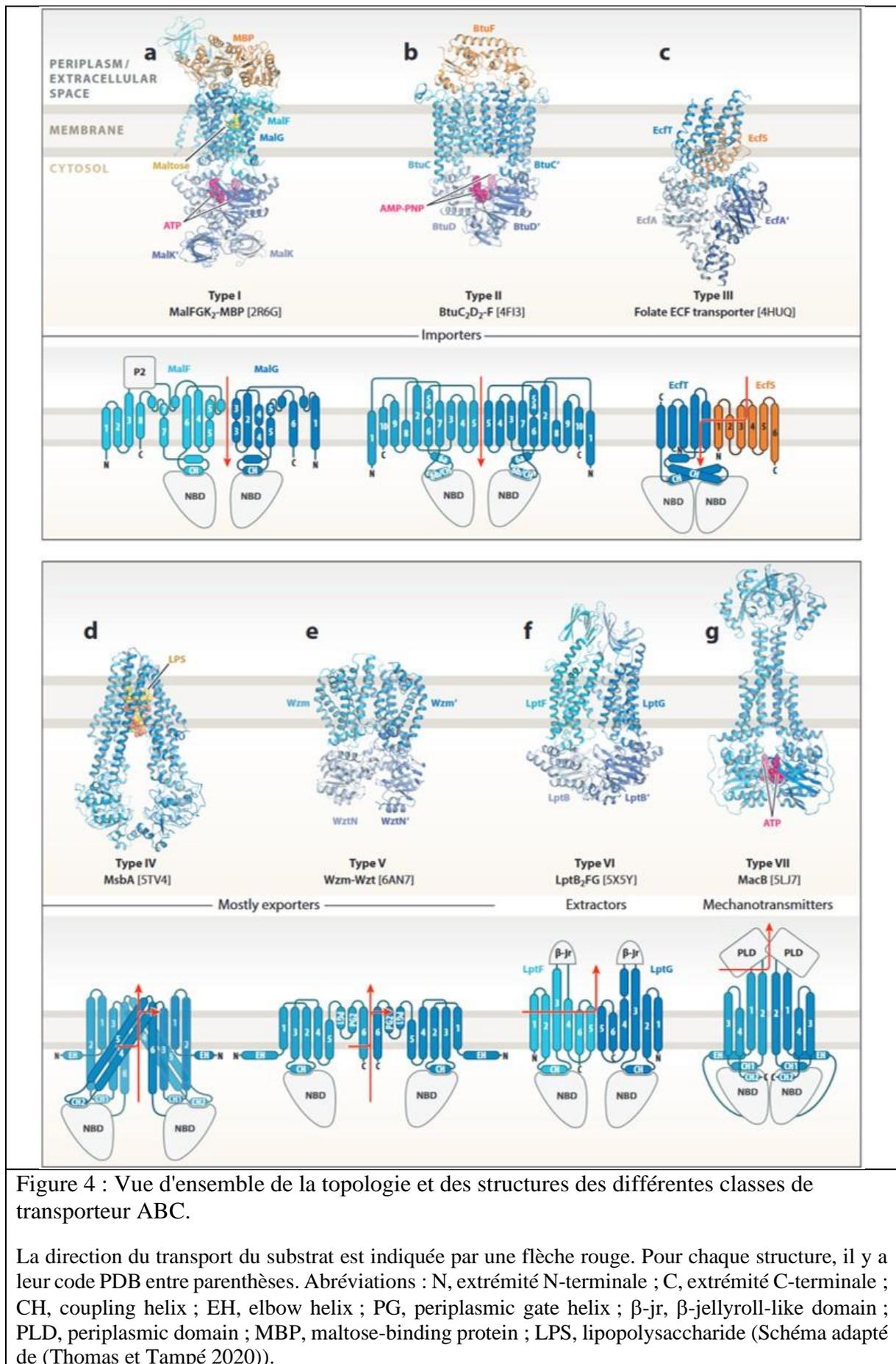
En résumé, les bactéries ont pu développer une résistance adaptative et réversible vis-à-vis d'une large gamme d'antibiotiques grâce à ces pompes d'efflux. Leurs génomes comportent environ 5 à 10 % de gènes impliqués dans le transport dont 1 à 2% correspondant aux transporteurs ABC (Davidson et al. 2008; Linton et Higgins 1998; Saier et Paulsen 2001), ce qui renforce l'intérêt d'étudier ces systèmes dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

1.3 Les transporteurs ABC

Une nouvelle classification des transporteurs ABC a été élaborée, d'après l'homologie de séquence et l'architecture des domaines transmembranaires (Thomas et Tampé 2020). Ils peuvent être partagés en 7 familles, représentés dans la figure 4.

Parmi ces transporteurs ABC, il existe :

- Des importateurs (type I-III) : ils sont principalement présents chez les procaryotes, avec des fonctions liées à l'import de nutriment comme des acides aminés, des sucres ou encore des métaux essentiels (Berntsson et al. 2010). Les importateurs fonctionnent avec une protéine extracellulaire supplémentaire (SBP, substrate-binding protein), fusionnées aux TMDs chez les Gram positif ou présent dans le périplasme pour les Gram négatif. Le substrat sera directement amené aux domaines transmembranaires par l'intermédiaire d'un SBP. Plusieurs catégories ont été identifiées en fonction du ou des substrats pris en charge (Berntsson et al. 2010).
- Des exportateurs (type IV-V) : ils sont présents dans tous les règnes de la vie, avec une fonction d'export de composés toxiques ou de médicaments. En effet, ces transporteurs permettent d'abaisser le niveau intracellulaire du xénobiotique en dessous de son seuil de cytotoxicité pour que la bactérie survive. La différence entre les types IV et V est le croisement des domaines transmembranaires par les hélices TM n° 4 et 5.
- Des extracteurs (type VI) : Les membres de cette famille exportent le lipopolysaccharide (LPS) mature de la membrane interne à la membrane externe (Owens et al. 2019).
- Des mécano-transmetteurs (type VII) : Ce sont principalement des assemblages tripartites, qui sont insérés à la fois dans la membrane interne et externe des bactéries à Gram négatif. Cette disposition a été décrite précédemment avec AcrAB-TolC. Un exemple de transporteur ABC appartenant à un système tripartite est MacB, avec MacA en MFP et TolC en OMF. Il exporte des antibiotiques de type macrolide, des ions métalliques et des toxines peptidiques (Okada et Murakami 2022).



Depuis plus de 50 ans d'études sur les transporteurs ABC (Theodoulou et Kerr 2015), de nombreuses données biochimiques et structurales se sont accumulées permettant de mieux comprendre l'architecture, le fonctionnement et la dynamique de ces protéines. Dans la suite du manuscrit, je vais me concentrer sur la classe des exportateurs de type IV dont BmrA fait partie.

1.3.1 Topologie :

Les transporteurs de type IV partagent une architecture commune en quatre domaines (Figure 4) :

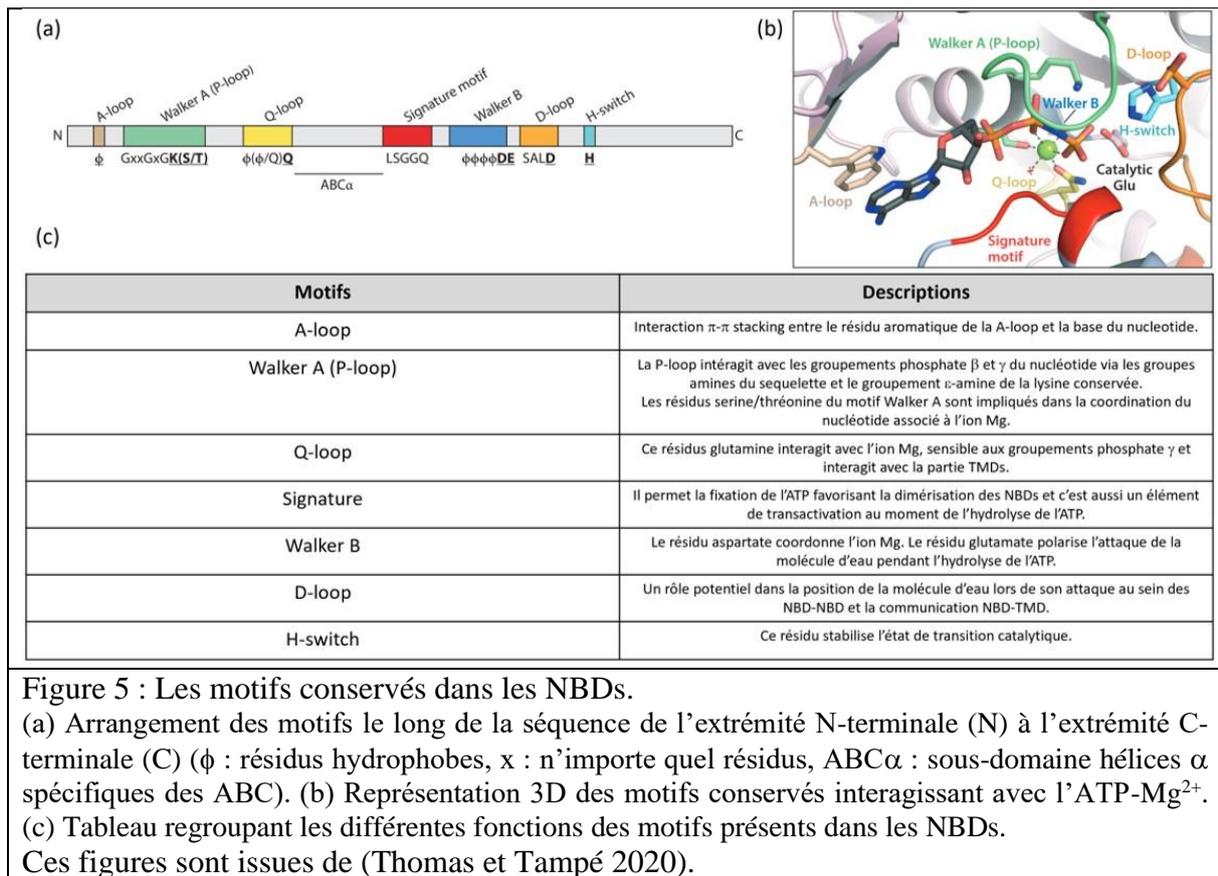
- Deux domaines transmembranaires (TransMembrane Domain, TMD) composés de 6 hélices α transmembranaire, en moyenne, où se trouve la poche de fixation des différentes molécules exportées à travers la membrane ;
- Deux domaines nucléotidiques (Nucleotide-Binding Domain, NBD) qui peuvent dimériser pour former deux sites de fixation nucléotidiques (Nucleotide-Binding Site, NBS), en présence soit de l'ATP-Mg²⁺ ou d'autres nucléotides ainsi que la capacité à catalyser leurs hydrolyses (Senior et Gadsby 1997).

Chez les bactéries, ces transporteurs peuvent être formés soit à partir de domaines individuels ou par l'assemblage de « demi-transporteurs » composés d'un NBD et un TMD sous forme d'homodimère ou hétérodimère. Or, chez les eucaryotes, deux « demi-transporteurs » peuvent être assemblés, ou sinon un seul polypeptide peut contenir les quatre domaines.

1.3.2 Domaines nucléotidiques et transmembranaires

- Domaines nucléotidiques :

La séquence des domaines nucléotidiques est hautement conservée au sein des transporteurs ABC (Oswald, Holland, et Schmitt 2006). Elles présentent de nombreux motifs qui sont essentiels pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. La figure 5 montre leur disposition accompagnée d'un tableau rappelant leurs rôles :



D'un point de vue structural, un NBD est constitué d'un domaine RecA-like avec un repliement de type Rossmann dont le motif Walker A se trouve dans un domaine de quatre hélices α , contenant le motif signature des transporteurs ABC (« LSGGQ »). La fixation de l'ATP va coordonner les deux NBDs dans une disposition tête-bêche. Autrement dit, l'ATP sera pris en « sandwich » avec les résidus de la P-loop du NBD1 et le motif signature du NBD2.

- Domaines transmembranaires :

Contrairement aux NBDs, les domaines transmembranaires présentent une grande diversité de séquence en raison de leurs poly-spécificités de substrats (Gutmann et al. 2010). Dans ces domaines, il y a entre 6 à 10 hélices α transmembranaires, avec la présence d'hélices couplantes (CH) à l'interface entre les NBDs et les TMDs. Chez les exportateurs de type IV et V, on peut aussi retrouver une hélice parallèle aux feuillet interne de la bicouche lipidique, connu sous le nom de « elbow helix » (EH), à l'extrémité N-terminale. Elle aurait un rôle de stabilisation, d'ancrage à la membrane (Ellinghaus et al. 2021; Khunweeraphong, Stockner, et Kuchler 2017) ainsi qu'une potentielle participation pour l'entrée des substrats dans les TMDs. En effet, l'hélice EH présente chez MsbA est capable d'interagir avec la daunorubicine (Smriti, Zou, et Mchaourab 2009).

1.3.3 Mécanisme des exportateurs de type IV

Grâce à la cryoEM, le nombre de structures 3D d'exportateurs résolues n'a cessé d'augmenter. Ceci apporte de nouvelles informations précieuses au niveau structural ainsi que sur leur mécanisme. Toutefois, les détails mécanistiques restent très débattus au sein de la communauté scientifique. Néanmoins, un consensus est établi sur la prise en charge des substrats par les transporteurs ABC. Ils suivent tous un mécanisme d'accès alterné, proposé par Jardetzky en 1966 (Jardetzky 1966). Le principe de ce mécanisme se base sur l'accès alterné du substrat entre deux conformations (IF et OF) du transporteur.

Dans un premier temps, le substrat se fixe avec une bonne affinité dans une cavité au sein des TMDs, dans la conformation ouverte vers l'intérieur de la cellule (IF). Ensuite, la fixation de deux molécules d'ATP dans les NBDs va favoriser leurs dimérisations. Ce rapprochement va générer des changements conformationnels qui seront communiqués aux TMDs. Le transporteur va alors adopter une conformation ouverte vers l'extérieur (OF) où l'affinité pour le substrat sera moins bonne. Ainsi, il sera expulsé dans l'espace extracellulaire. Enfin, le retour à la conformation IF est permise par l'hydrolyse de l'ATP et la libération des produits de la réaction. La figure 6 rappelle ce mécanisme globale dans le contexte des exportateurs.

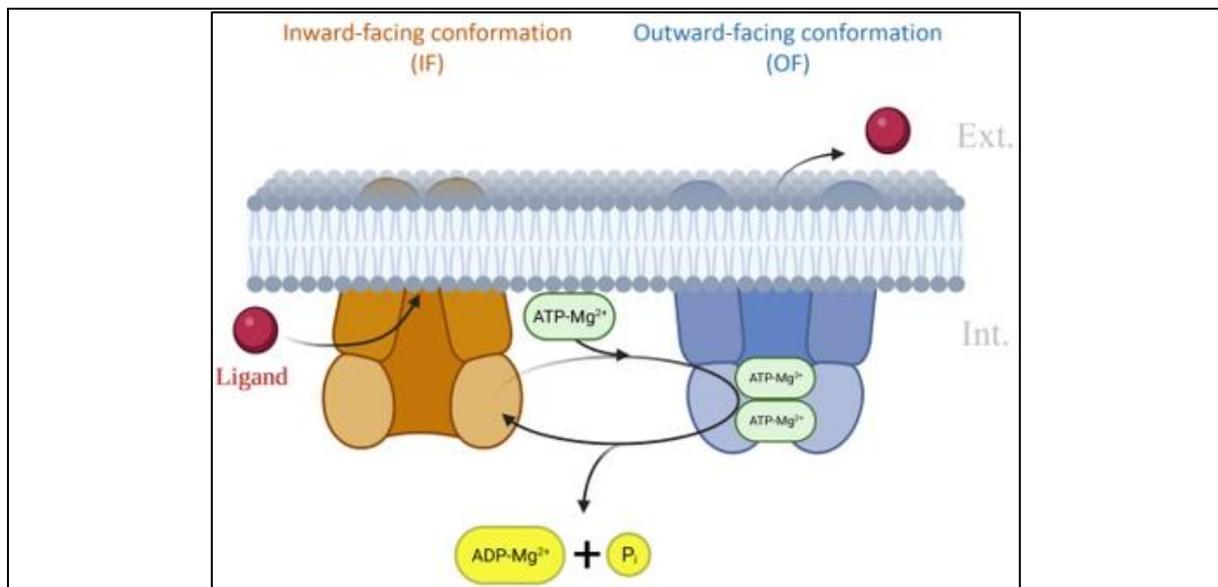


Figure 6 : Principe du mécanisme d'accès alterné décrit par Jardetzky en 1966 pour les transporteurs.

Toutefois, le détail de certaines étapes de ce mécanisme reste à élucider, notamment sur le cycle catalytique de l'ATP, la fixation et le transport du substrat dans les TMDs ainsi que la communication entre les NBDs et les TMDs pendant les changements conformationnels produits au cours du cycle. De plus, certaines spécificités vont dépendre du type d'exportateurs et du substrat transporté. Je vais présenter les différents modèles proposés pour les exportateurs et la partie Résultats du manuscrit se focalisera sur le mécanisme de BmrA.

- Les modèles du cycle catalytique :

La nature très conservée des NBDs implique un mécanisme commun de fixation et d'hydrolyse de l'ATP chez les transporteurs ABC. Le rapprochement des NBDs est favorisé par la présence de molécules d'ATP ainsi que l'augmentation de l'enthalpie d'hydratation (les molécules d'eau sont expulsés à l'interface entre les NBDs). À l'aide de la dynamique moléculaire, le transporteur CFTR en membrane, par exemple, a permis de proposer les étapes de fermeture des NBDs (Furukawa-Hagiya et al. 2013). Ce processus est relativement très rapide, d'environ 10 ns. La première étape est un contact partiel des NBDs à la suite de la fixation d'ATP, qui dure environ 1,4 ns. La deuxième étape est le rapprochement en face-à-face des NBDs entre 1,4 à 4 ns. Enfin, la dernière étape est un arrangement structural des NBDs qui peut durer plus de 4 ns. L'énergie libre générée par la fixation de l'ATP est convertie en force mécanique qui est communiquée aux TMDs par les hélices couplantes. L'introduction de mutations dans ces hélices peut provoquer soit des assemblages incorrects et un découplage pour le transport. Dans le cas de MsbA, la mutation du CH2 diminue fortement l'activité ATPasique et impacte la transition IF vers OF (Furuta et al. 2014; Loo, Bartlett, et Clarke 2013; Novischi et al. 2024).

Les simulations de dynamique moléculaire réalisées sur une durée de 1,5 μ s du transporteur TM287/288, de la bactérie *Thermotoga maritima* ont permis de décomposer les changements de conformations au sein de ce transporteur, de la fixation de molécules d'ATP au relargage du substrat (Göddecke et Schäfer 2020). En particulier, la transition entre la conformation IF et la conformation OF, en passant par une conformation occlue, est d'environ 300 ns. Cette dynamique a été réalisée en membrane lipidique à une température de 100 °C, compte tenu de la nature extrêmophile de la bactérie.

Enfin, la dissociation des NBDs nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Le mécanisme réactionnel suit un modèle de catalyse acide-base générale (Figure 7). Le résidu glutamate du motif Walker B agit comme une base catalytique pour prendre le proton de l'eau. Ceci a été vérifié chez BmrA (Orelle et al. 2003) et P-gp (Sauna et al. 2002), en mutant ce résidu. Ensuite, la molécule d'eau potentialisée va réaliser une attaque nucléophile sur le phosphate γ (Amano et al. 1994). De plus, l'histidine appartenant à la boucle H (H-loop) pourrait aussi jouer un rôle dans la position du glutamate, l'ATP et la molécule d'eau formant une dyade catalytique. D'ailleurs, l'énergie d'hydrolyse totale libère une énergie exothermique de 10 kcal/mol. Enfin, la présence des produits de la réaction (ADP et P_i) rend le dimère moins stable, d'un point de vue énergétique. Par conséquent, l'étape limitante n'est pas l'hydrolyse de l'ATP mais la libération des produits (Stefan, Hofmann, et Tampé 2020). Il existe d'autres modèles comme la catalyse assistée par l'ATP donnant un rôle plus important à la boucle H, décrite chez HylB d'*E. coli* (Zhou, Ojeda-May, et Pu 2013).

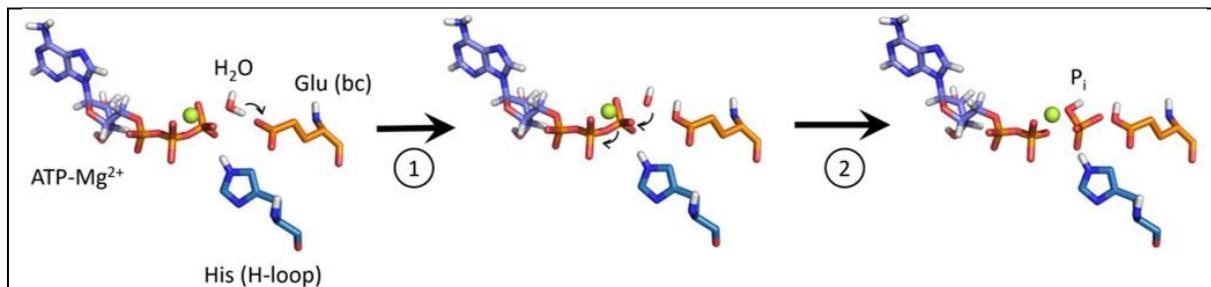


Figure 7 : Mécanisme réactionnel d'hydrolyse d'ATP (catalyse générale de base).

(1) Protonation du résidu glutamate (bc : base catalytique) par une molécule d'eau. (2) Attaque nucléophile de l'ion hydroxyde sur le phosphate γ , puis formation d'un phosphate (P_i) tétraédrique. (Glu : Glutamate ; His : Histidine) (Schéma adapté de (Szöllösi et al. 2018)).

Cependant, les nombreuses données expérimentales acquises ont fait émerger plusieurs modèles du cycle catalytique soit : (1) une séparation des NBDs ou (2) un contact permanent entre les NBDs pendant le cycle. Les deux modèles sont illustrés dans la figure 8. Le point commun entre ces modèles est la dimérisation complète des NBDs induite par la fixation de deux molécules d'ATP (Janas et al. 2003; Zoghbi et Altenberg 2014).

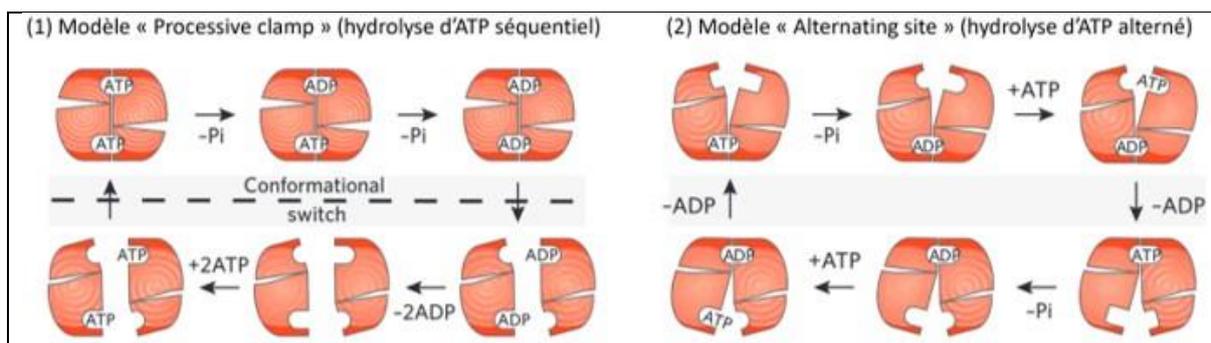


Figure 8 : Deux modèles possibles pour le cycle catalytique au niveau des NBDs.

(Schéma adapté de (Parcej et Tampé 2010)).

(1) Ce modèle est aussi désigné par « Tweezers-like » (J. Chen et al. 2003), « ATP switch » (Christopher F. Higgins et Linton 2004) et « Processive clamp » (Janas et al. 2003). Il repose sur l'hydrolyse séquentielle des deux molécules d'ATP pour permettre l'ouverture du dimère. Au cours du cycle, des changements conformationnels se produisent au moment de la fixation des molécules d'ATP ainsi que l'hydrolyse. Les structures de Sav1866 (Dawson et Locher 2007) apportent des preuves pour ce type de modèle. En effet, deux types de conformations sont visibles dont l'une où les NBDs sont sous la forme d'un dimère fermé en présence de molécules d'ATP dans chacun des NBS (OF) et l'autre où il y a une séparation nette des NBDs (IF).

(2) L'autre modèle pour le cycle catalytique est un contact continu entre les NBDs, notamment connu sous les noms de « constant contact model » (P. M. Jones et George 2009), « alternating site model » (Senior, al-Shawi, et Urbatsch 1995) ou encore « nucleotide occlusion model » (Sauna et al. 2007; Siarheyeva, Liu, et Sharom 2010). Ainsi, l'hydrolyse des molécules d'ATP se fait de façon alternée, c'est-à-dire la

libération de l'ADP et du P_i se produit dans un NBS, et l'hydrolyse de l'autre molécule d'ATP s'effectue dans le second NBS. Ceci est démontré dans les résultats obtenus avec la P-gp en présence de vanadate (Vi), qui se substitue au phosphate γ après son hydrolyse et permet de bloquer le complexe sous la forme ADP- Vi . Ils ont constaté que les NBS ne fonctionnent pas de façon indépendantes car il n'y avait qu'un seul site NBS avec le complexe ADP- Vi (Urbatsch et al. 1995). D'autres données complémentaires sur les protéines LmrA (van Veen et al. 2000) et MsbA (Mittal et al. 2012) montrent cette hydrolyse alternée.

Les modèles catalytiques suggèrent qu'il existe une communication bidirectionnelle entre les NBDs et les TMDs pour vectoriser le transport du substrat à travers la membrane. Un autre modèle a été proposé qui combine le modèle « Alternating site » couplé au transport de substrat. Ce modèle « Reciprocating » se base sur la présence de deux canaux équivalents pour le transport de substrat, couplé à un NBS fonctionnant en décalage de 180° (P. M. Jones et George 2023). De plus, la fixation de substrats dans les TMDs stimule l'activité ATPasique de certains transporteurs, c'est notamment le cas pour la P-gp (Scarborough 1995) ou encore MsbA (Eckford et Sharom 2008), renforçant ce modèle.

- Le modèle du transport des substrats à travers la membrane :

D'après le mécanisme d'accès alterné, le substrat va avoir différentes affinités pour sa poche de fixation dans les TMDs, en fonction des conformations adoptées par le transporteur. Cette cavité est variable et modulable en raison de la diversité des substrats transportés. Cependant, l'adaptation du substrat au sein de la cavité ne nécessite pas d'être parfaite, il suffit seulement que le substrat s'accommode dans cette poche et qu'il soit hydrophobe (Aa 2002). Quelques structures d'exportateurs en présence de leurs substrats existent comme BmrA avec la R6G (code PDB : 7BG4), MsbA avec le LPS et des inhibiteurs (code PDB : 6BPL, 7MEW), ou PCAT1 avec un peptide CtA (code PDB : 6V9Z). Le substrat possède normalement une meilleure affinité dans la conformation IF, mais son entrée dans les TMDs n'est pas totalement encore comprise. Néanmoins, il pourrait passer soit directement depuis le cytoplasme ou alors par le feuillet interne de la membrane plasmique. La dernière option est décrite par le modèle « hydrophobic vacuum cleaner », d'après les données issues de la P-gp avec la doxorubicine (Cf et Mm 1992; Fj 2014). On peut aussi retrouver ce mécanisme avec MsbA, qui est une flippase, qui transporte le lipide A (Eckford et Sharom 2008).

Le chemin emprunté par le substrat à travers les TMDs est unidirectionnel, mais il est très peu décrit dans la littérature. En effet, plusieurs phénomènes interviennent dans ce processus comme le mouvement des hélices transmembranaires, les interactions électrostatiques et hydrophobes avec le substrat. La cavité des ligands va donc être modulée et déformée au cours du transport. Un exemple concret avec le transporteur Atm1 révèle le chemin possible emprunté par le substrat grâce à l'acquisition de plusieurs structures (Fan, Kaiser, et Rees 2020). Grâce à ce travail, ils ont calculé la cavité de fixation du substrat dans ces différents états conformationnels, obtenus en utilisant soit des ponts disulfures, des mutants du glutamate catalytique ou des analogues de l'ATP. La figure 9 montre donc l'ensemble de ces états acquis par cryoEM. De même, l'article décrit la participation de l'hélice TM6 sur le site de fixation du glutathion, notamment le coude présent dans cette hélice élimine la cavité du substrat après l'hydrolyse de l'ATP.

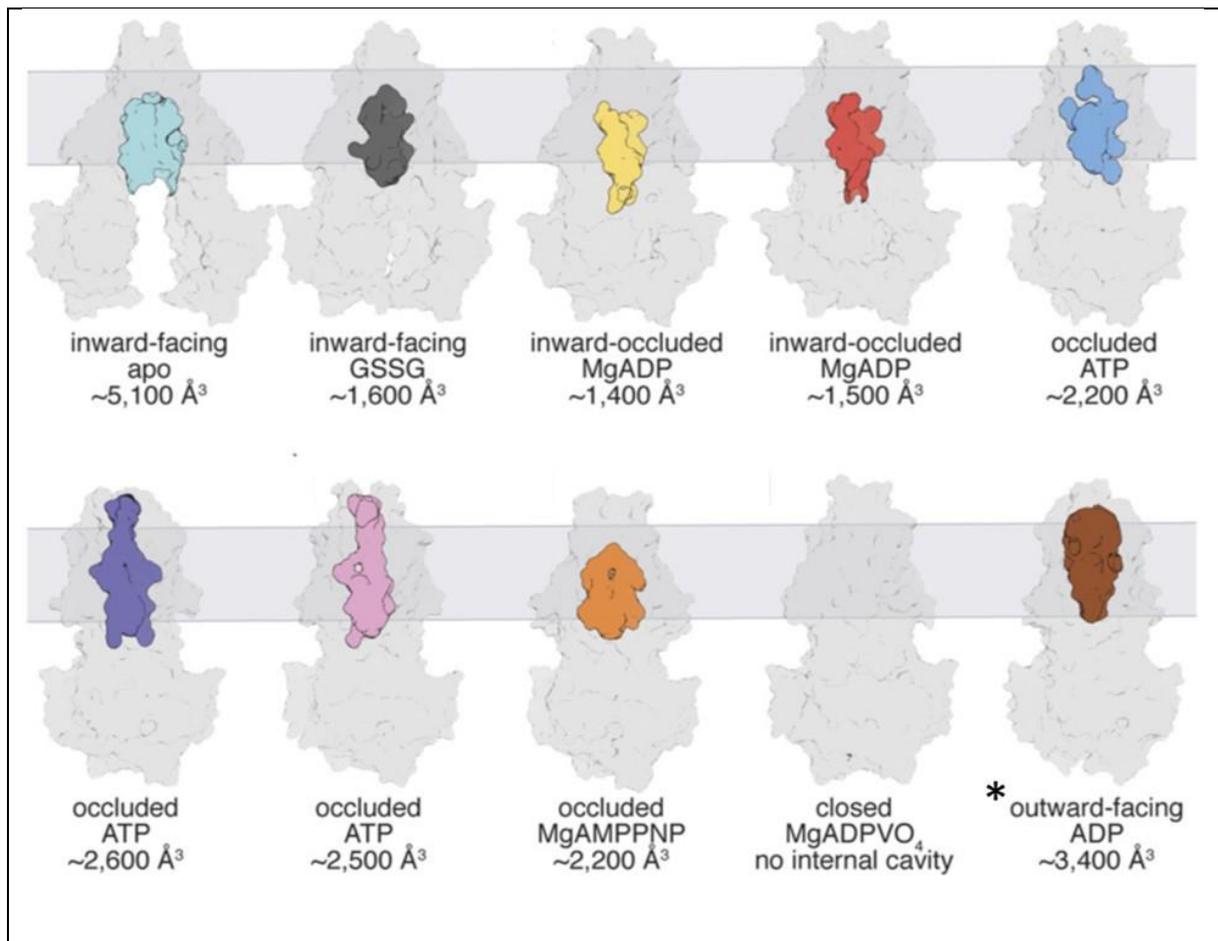


Figure 9 : Comparaison des volumes de la cavité fixant le substrat entre plusieurs structures du transporteurs NaAtm1.

L'ensemble des structures ont été obtenu soit par cristallographie aux rayons X ou cryoEM. Sous chacune des structures se trouvent sa conformation, les conditions employées et le volume interne de la cavité. La dernière structure (*) provient de Sav1866 comme référence pour l'état OF. (GSSG : glutathion, VO₄ : vanadate) (Image issue de (Fan, Kaiser, et Rees 2020)).

Une autre étude récente sur le transporteur P-gp a aussi permis de décomposer le chemin du substrat à travers les TMDs, et surtout le rôle régulateur de l'hélice TM1 (Gewering et al. 2024). Pour cela, ils l'ont caractérisé par cryoEM en capturant différentes conformations durant le cycle de transport, en présence d'un substrat cyclique qui a été attaché de façon covalente sur des sites précis dans les TMDs. Ces expériences ont montré la plasticité de l'hélice TM1 durant les différentes étapes de transport.

D'autres hélices transmembranaires interviennent dans l'expulsion du substrat, notamment les hélices TM1 et 2 ayant un mouvement d'éventail, décrit pour BmrA. En effet, la superposition des structures d'exportateurs montre la flexibilité de ces hélices, représenté dans la figure 10 (Chaptal et al. 2022). Pour BmrA, il est postulé qu'il y a une déformation de la structure autour du site de fixation du substrat, dont les résultats montrés plus bas semblent le confirmer.

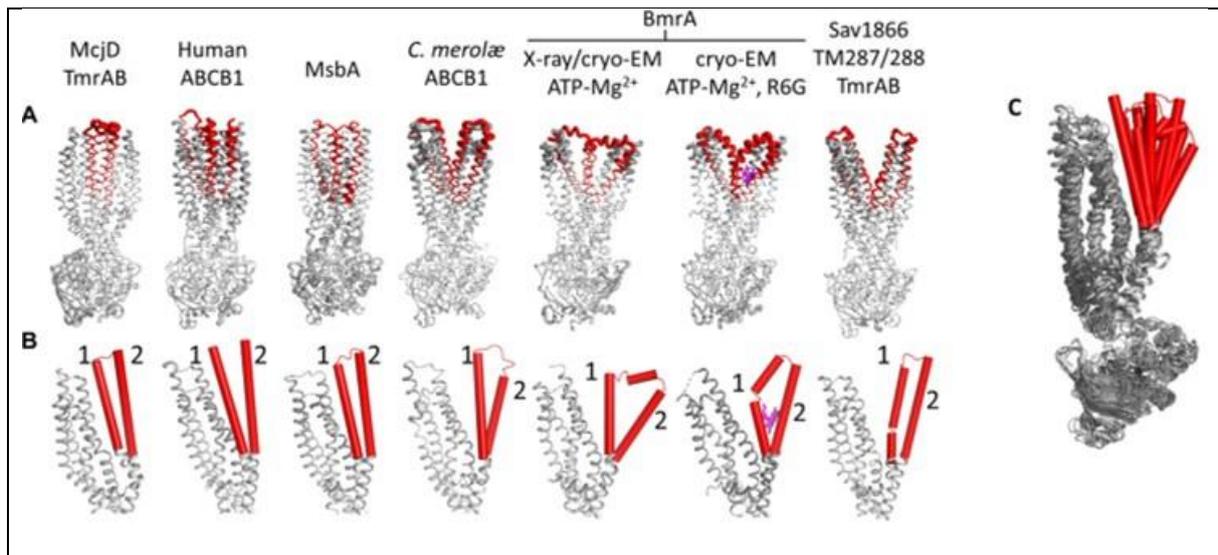


Figure 10 : Visualisation de la mobilité des hélices TM1-2 dans la conformation OF chez les exportateurs.

(A) Structures des exportateurs (code PDB) : McjD (4PL0), TmrAB (6RAI), ABCB1 (6A6M), MsbA (5TTP), BmrA (7OW8, 7BG4), Sav1866 (2HYD) et TM287/288 (6QV0). (B) Zoom sur un monomère des hélices TM1-2, représentés en rouge. (C) Superposition des structures présentes dans (A), montrant la flexibilité des hélices TM1-2 (Image issue de (Chaptal et al. 2022)).

En conclusion, l'étude du mécanisme de transport n'est pas triviale et pourrait être spécifique à chaque transporteur. Plusieurs moyens ont été utilisés afin de décortiquer le chemin du substrat au sein des TMDs. La première option est le contrôle de l'état ouvert ou fermé des NBDs, ce qui permet par extension de capturer des états conformationnels distincts comme les conformations IF, OF et même occlus. Ceci peut être permis soit en utilisant des analogues de l'ATP (AMP-PNP, ATP γ S, ...) (Lacabanne et al. 2020), des mutants au niveau des motifs conservés comme celui de la base catalytique (Chaptal et al. 2022; Fan, Kaiser, et Rees 2020; Schultz, Merten, et Klug 2011) ou encore le recours à la formation de ponts disulfures entre les NBDs (Di Cesare et al. 2024). D'autres outils sont aussi employés comme la fixation de nanobodies (Anticorps à domaine unique, VHH) affins pour des états spécifiques du transporteurs (Hutter et al. 2019) ou bien des inhibiteurs. L'intérêt de ces outils est de permettre d'explorer les états conformationnels du transporteur en présence du substrat. De plus, l'interprétation mécanistique de ces structures n'est pas si simple et doit être mis en parallèle avec les données expérimentales. Néanmoins, il reste encore beaucoup de questions sans réponse à propos de la stœchiométrie entre le nombre de molécules d'ATP hydrolysées par substrat transporté, la communication entre NBDs et TMDs, et la poly-spécificité. Grâce à l'utilisation de plus en plus importante de la cryoEM, de nouvelles informations précieuses au niveau de la structure et du mécanisme de ces transporteurs ABC sont disponibles. Je décrirai l'importance de la cryoEM pour la compréhension du mécanisme et de la dynamique de ces transporteurs dans la suite du manuscrit.

1.4 La cryoEM, un outil pour l'étude conformationnelle des transporteurs ABC

La biologie structurale des transporteurs ABC a beaucoup évolué, et le nombre de structures résolues ne cesse d'augmenter dans la PDB. La cristallographie aux rayons X et la cryoEM ont été employées pour obtenir la structure à haute résolution de ces protéines membranaires. Elles ont chacune des avantages et des inconvénients.

Dans le cas de la cristallographie aux rayons X, la formation de cristaux reste une étape très délicate mais il n'y a pas de contrainte en ce qui concerne la taille. La cryoEM est un bon compromis pour les protéines membranaires en raison de la faible quantité nécessaire et de la taille (> 50 kDa). Un autre avantage est l'observation de la variabilité entre les particules, que je détaillerai plus loin dans le manuscrit.

1.4.1 La microscopie électronique en quelques mots

Le premier microscope électronique à transmission a été inventé en 1933 par Ernst Ruska et Max Knoll. Le principe est d'utiliser un faisceau d'électron qui va interagir avec l'échantillon biologique pour créer son image projetée sur un écran. L'histoire de la microscopie électronique a énormément évolué tout en repoussant ses limites pour améliorer la résolution des objets biologiques observés. C'est à partir des années 80 qu'une grande avancée a été réalisée par l'équipe de Jacques Dubochet qui a mis au point la vitrification d'échantillon en utilisant l'éthane liquide (Dubochet et al. 1988). La congélation rapide à très basse température permet d'éviter la cristallisation de l'eau et favoriser la formation d'une glace vitreuse. L'observation de l'échantillon est effectuée sous vide à -180 °C. Ensuite, l'équipe de Joachim Frank a développé une méthode de reconstruction 3D à partir des images 2D, en utilisant une faible intensité d'électron pour limiter les dommages causés sur l'échantillon (J. Frank 1975; van Heel et Frank 1981; Penczek, Zhu, et Frank 1996). Enfin, Richard Henderson a été le premier à proposer un modèle atomique d'une protéine membranaire à l'aide de la cryoEM (Henderson et Unwin 1975). Ces trois personnes ont reçu le prix Nobel de chimie en 2017 grâce à leurs travaux dans le développement de la microscopie électronique en condition cryogénique. Cette technique a néanmoins subi une révolution, mentionné sous le terme de « The resolution revolution » (Kühlbrandt 2014), qui correspond à un développement technologique de l'appareillage (des détecteurs à détection directe, de nouveaux microscopes plus puissants avec un voltage de 300 keV, des canons d'électrons cohérents, et de meilleurs systèmes optiques) et des logiciels de traitement des données (cryoSPARC, Relion, ...). La figure 11 montre le remarquable passage d'une science de la « blobology » à l'obtention de résolution plus fine au niveau atomique des protéines grâce à la cryoEM.

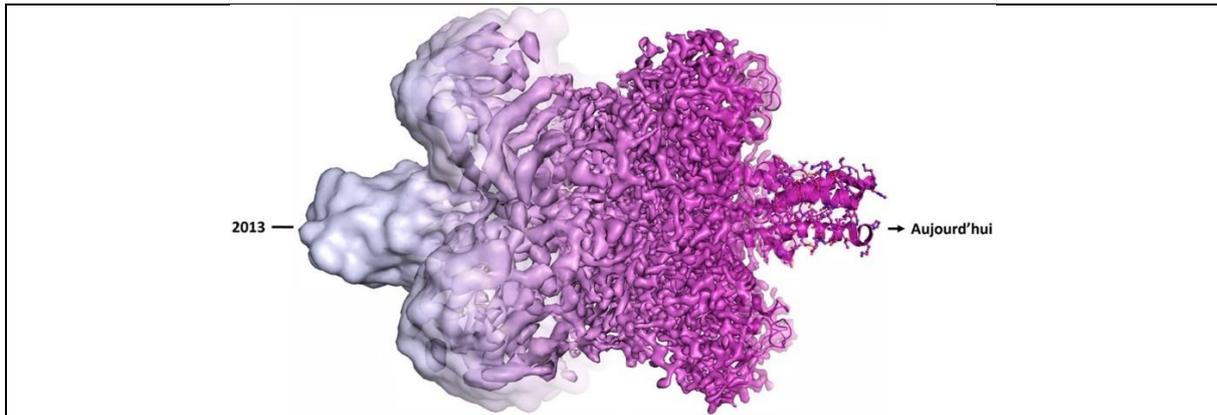


Figure 11 : Evolution de la résolution des structures obtenues par cryoEM de 2013 à aujourd'hui.

Illustration réalisée par Martin Högbom, Royal Swedish Academy of Sciences.

1.4.2 De la préparation d'échantillon aux traitements de données cryoEM

Comme illustré dans la figure 12, l'obtention de la structure 3D d'une protéine passe par plusieurs étapes, qui peuvent être optimisées dans le but d'avoir la meilleure résolution possible.

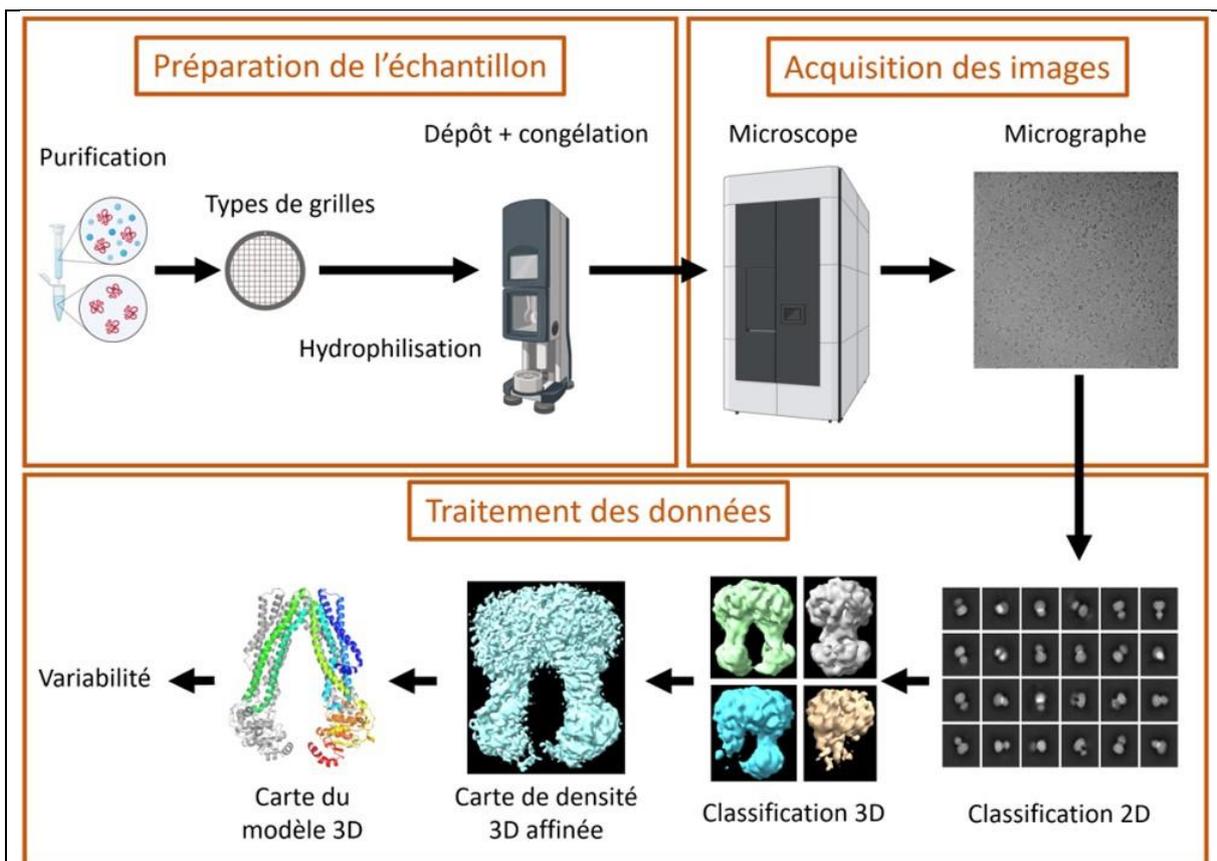


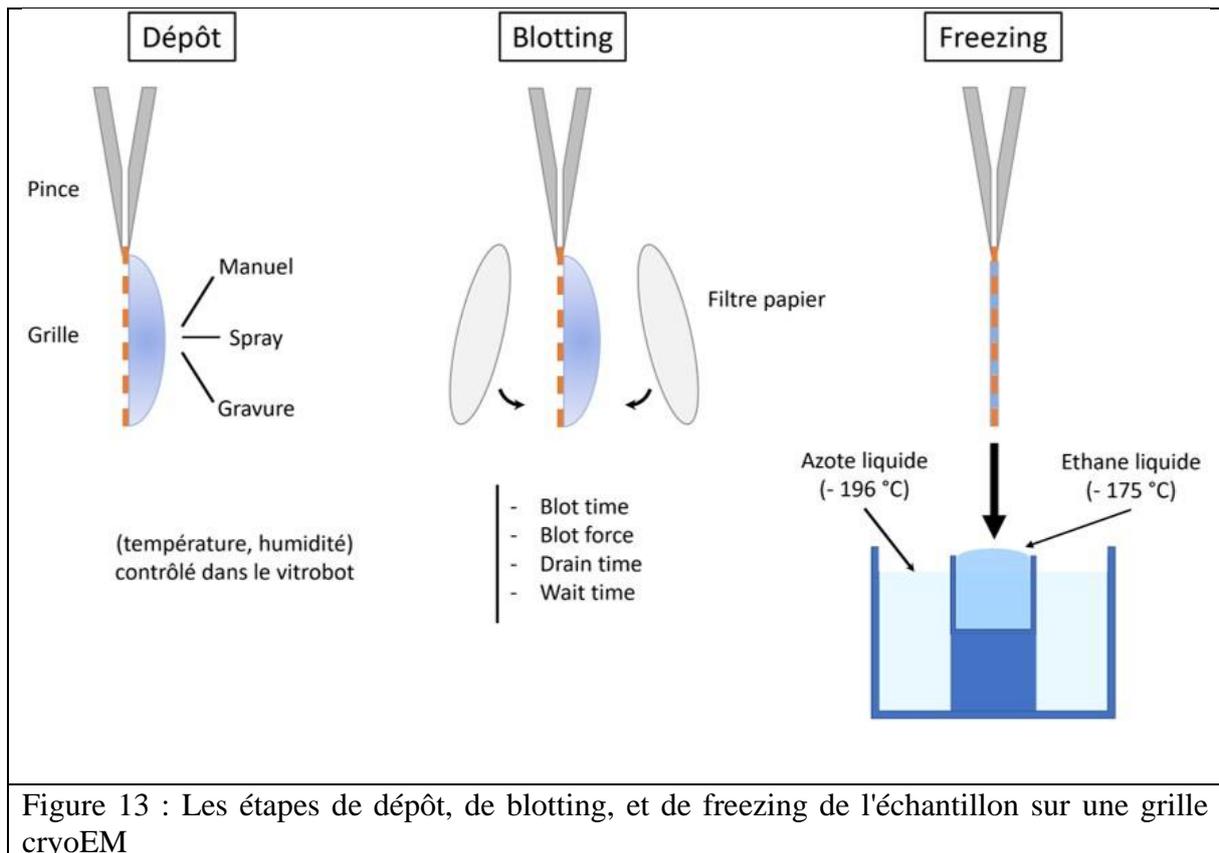
Figure 12 : Les différentes étapes pour la résolution d'une structure 3D par cryoEM

La première étape nécessite des optimisations qui dépendent de l'échantillon. Le temps à consacrer est très variable. La collecte de données par le microscope peut prendre entre 24 h et 48 h pour avoir assez d'images. Par contre, le traitement des données peut prendre plusieurs mois.

Le premier point est d'optimiser l'échantillon, en améliorant sa purification afin d'avoir l'échantillon le plus optimal possible d'un point de vue biochimique, c'est-à-dire pure, homogène, sans agrégation, et fonctionnel. Cette étape ne peut pas être standardisée car cela dépend de la nature de la protéine étudiée. Plusieurs points sont à prendre en compte avant de déposer sur grille comme le type de tampon (concentration de sel, glycérol, le pH, ...), la concentration de l'échantillon, et l'utilisation d'environnements amphipathiques (polymères, détergents, nanodisques, ...) dans le cas des protéines membranaires (Autzen, Julius, et Cheng 2019). Je détaillerai ce point dans le prochain paragraphe. Toutefois, la coloration négative s'avère être utile pour contrôler rapidement la qualité de l'échantillon avant de passer en cryoEM.

Une fois l'échantillon prêt, il devra être déposé sur le bon type de grille et être vitrifié (Figure 13). Une grille cryoEM a un diamètre de 3 mm, composé d'un support et d'une membrane. Le support est fait de cuivre ou d'or. Il joue un rôle de support mécanique, de conducteur de faisceau d'électron et dissipateur de chaleur (Karuppasamy et al. 2011). La membrane est composée de carbone ou d'or, perforé de trous micrométriques. Parmi ces grilles, il en existe de nombreuses sur le marché qui varient en fonction du support, de la membrane, et du nombre de trous.

Avant d'être utilisée la grille doit d'abord subir une hydrophilisation pour améliorer l'adsorption de l'échantillon. Cette étape d'effluage est réalisée en appliquant un plasma d'argon. L'étape suivante est de déposer l'échantillon sur la grille, soit de façon manuelle par spray, ou par gravure (Weissenberger, Henderikx, et Peters 2021). Pour avoir un film liquide très mince, deux papiers absorbants sont appliqués de part et d'autre de la grille (étape de « blotting ») à l'aide d'un appareil dédié comme le Vitrobot (Thermo Fisher Scientific). L'optimisation de certains paramètres (force, temps de « blotting », humidité, température) est effectués pour avoir une épaisseur de glace convenable pour une bonne observation des particules. La grille est ensuite plongée rapidement dans l'éthane liquide (abaissement de la température supérieur à 10 000 K/s) afin de vitrifier l'échantillon (étape de « freezing ») (Engstrom et al. 2021). Il ne faut jamais que la température de la grille remonte au-dessus de -150 °C, pour éviter de former de la glace cubique, rendant l'observation difficile voire impossible. Le cryogène employé doit limiter les effets de caléfaction à la surface de l'échantillon. C'est pourquoi, l'éthane liquide est un bon candidat car il possède une température de fusion (-183,45 °C) assez éloignée de sa température d'ébullition (-88,75 °C). Ainsi, la grille va plonger dans l'éthane liquide à -175 °C sans atteindre son point d'ébullition. De même, le mélange d'éthane et de propane est aussi utilisé comme cryogène (Tivol, Briegel, et Jensen 2008).



Ces étapes nécessitent une attention particulière dans leur réalisation pour éviter certains problèmes qui pourraient fortement affecter le traitement des données. Le point le plus important à ce niveau est d'éviter toute contamination de cristaux de glace (cubique et hexagonale) car ils sont denses aux électrons et apparaissent noirs lors de l'observation. Ensuite, un autre facteur capital est la qualité de la glace vitrifiée, notamment son épaisseur. Une glace trop épaisse ou trop fine ne permet pas de bien exploiter la grille car cela peut créer une mauvaise distribution des particules. Les conséquences pour la protéine sont nombreuses, par exemple, une orientation préférentielle, une dénaturation, une superposition de plusieurs particules en direction du faisceau d'électron, ou alors une glace fragile. Une étude a été menée sur plusieurs protéines pour voir l'impact de l'épaisseur de la glace sur l'observation des particules en cryoEM, grâce à la tomographie (Noble, Dandey, et al. 2018). L'épaisseur idéale est entre 50 – 100 nm, un résultat relatif pour des protéines qui ont une taille au-delà de 30 kDa. Ils ont aussi recensé les différents comportements de glace vis-à-vis des protéines étudiées.

Le but d'un microscope électronique est de projeter des images agrandies de l'échantillon. Pour cela, le microscope est composé de plusieurs éléments pour réaliser cette tâche :

- Un faisceau d'électron généré par un canon d'électron dont la tension d'accélération est typiquement de 200 ou 300 keV.
- Un système de lentilles électromagnétiques avec plusieurs rôles différents comme la formation d'un faisceau d'électrons parallèle sur l'échantillon, l'étalement du faisceau, ou alors former, agrandir, et projeter l'image de l'échantillon.
- Un détecteur comme les détecteurs à détection directe d'électrons, qui ont joué un rôle décisif dans l'amélioration de la résolution des images.

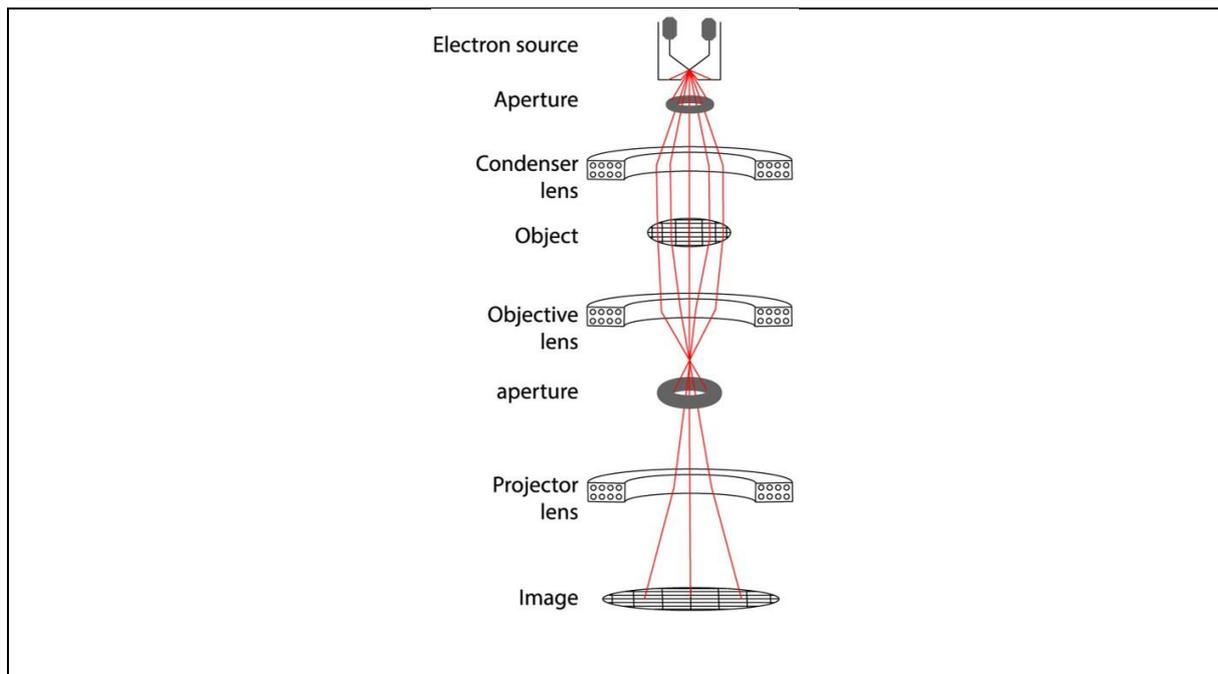


Figure 14 : Fonctionnement d'un microscope électronique à transmission.
 (Image issue de (Raimondi et al. 2022))

Ces éléments sont dans une colonne où règne un vide mais étant donné que l'échantillon est préalablement vitrifié, il n'y a pas de risque qu'il se déshydrate. Par contre, la dose maximale d'électron peut endommager l'échantillon et aussi influencer le rapport signal sur bruit. De plus, les aberrations du microscope (sphéricité, chromatique, l'astigmatisme) peuvent réduire la qualité de l'image. C'est pourquoi des outils comme SerialEM, EPU, Legion ont été développés pour collecter des images à des endroits différents de la grille, tout en limitant l'exposition de l'échantillon prolongée aux électrons. Par ailleurs, ceci induit des déplacements de l'échantillon (Naydenova, Jia, et Russo 2020) ce qui rend les images floues. Afin de surmonter ce problème, il est possible d'enregistrer ces images sous forme de film (« movies ») pour ne pas perdre de signal (Campbell et al. 2012).

Enfin, le traitement des données de cryoEM peut se faire à l'aide du logiciel cryoSPARC pour obtenir des structures 3D. Il existe d'autres logiciels qui permettent de faire ce travail comme Relion ou Scipion. Le but est de sélectionner les particules correspondant à la protéine pour les aligner et créer des classes 2D. En fonction des particules des classes sélectionnées, un modèle 3D *ab initio* est construit. Plusieurs affinements sont ensuite réalisés afin d'améliorer globalement ou localement la carte de potentiel coulombien du modèle, atteignant des résolutions subatomiques typiquement 2 Å. Ce paramètre est estimé à l'aide de la FSC (Gold-standard Fourier Shell Correlation) qui consiste à séparer le jeu de particules en 2 moitiés indépendantes pour être affinées séparément et les comparées. La FSC permet d'obtenir la résolution globale de la carte à partir d'un seuil à 0,143 (Cardone, Heymann, et Steven 2013).

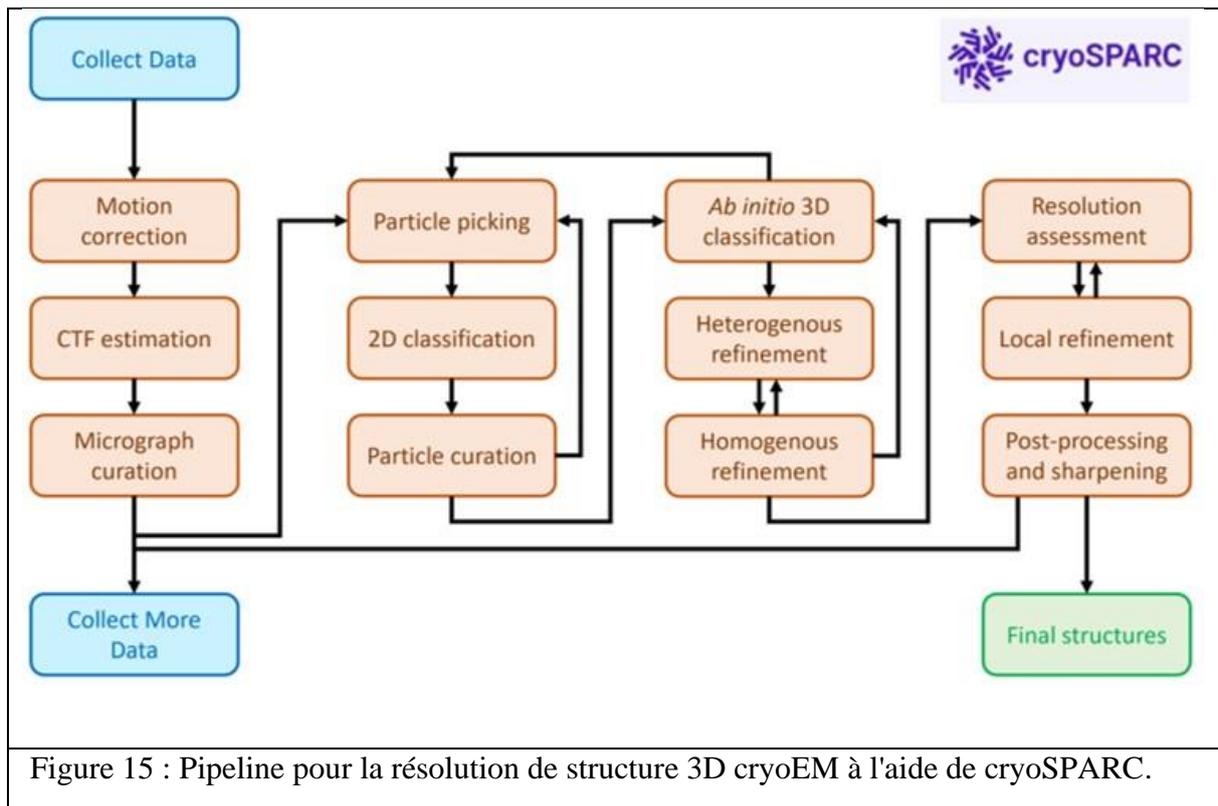


Figure 15 : Pipeline pour la résolution de structure 3D cryoEM à l'aide de cryoSPARC.

L'intérêt principal de la cryoEM est d'obtenir une structure 3D de la protéine en solution avec la meilleure résolution possible. La qualité de l'échantillon et la préparation des grilles impactent sur cette résolution. Par ailleurs, un autre paramètre à prendre en compte est la variabilité conformationnelle de la protéine présente sur la grille qui impacte sur le traitement des données. En effet, ce problème d'hétérogénéité en cryoEM est bien connu, et certains outils d'affinement ont été développés pour avoir accès à des structures dont les différences sont plus subtiles.

De plus en plus de personnes se tournent vers des conditions en turnover ou en temps résolu pour exploiter cette variabilité conformationnelle. En effet, le traitement des données cryoEM permettent d'identifier de nouvelles conformations, d'exploiter la flexibilité des protéines et d'interpréter les mouvements pour découvrir la mécanique des protéines. Cela s'accompagne d'un développement d'appareillage et de logiciel pour aider à analyser ces nouvelles données ce qui pourrait ouvrir vers une nouvelle ère d'étude des protéines. J'en parlerai dans la Partie 2 du manuscrit.

1.4.3 Publication 1 : L'étude des protéines membranaires par cryoEM

J'ai participé à la rédaction d'un chapitre mettant en lumière l'analyse des protéines membranaires par cryoEM et quelques aspects pratiques. Je résume ci-après les points traités dans cette publication.

Les protéines membranaires sont amphipathiques, c'est-à-dire, qu'elles possèdent une partie hydrophile et hydrophobe. Leurs stabilités nécessitent l'utilisation de détergents ou d'autres molécules/polymères amphiphiles, limitant le contact de la partie hydrophobe avec le solvant. Mais cela impacte la préparation de l'échantillon, la construction du modèle 3D et l'analyse de la protéine membranaire par cryoEM. En effet, un problème commun et majeur est l'orientation préférentielle associée à la nature hydrophobe de ces protéines qui favorise une localisation à l'interface air-eau. Ainsi, il est important de bien accorder le détergent, généralement avec une faible CMC, avec le type de grille, préférentiellement avec une membrane de carbone. Un autre paramètre à prendre en compte est la concentration de la protéine, idéalement supérieure à 2 mg/mL, afin d'avoir assez de particules sur la grille. De plus, il existe d'autres agents tensioactifs que les détergents comme des polymères (amphipols, SMA, ...), peptidiques, nanodisques ou encore liposomes. Ceci permet aussi de diminuer la concentration de protéines sur la grille, et de mimer un environnement lipidique autour de la protéine. Ces autres environnements permettent en outre d'augmenter le contraste des protéines membranaires, très utile pour celles de taille inférieure ou égale à 50 kDa. Enfin, ce type d'environnement améliore aussi l'alignement spatial des particules.

Dans le cas des détergents, il peut arriver d'avoir un doute sur la forme des particules présentes sur la grille, si elles correspondent vraiment à la protéine d'intérêt ou alors à des micelles. La concentration élevée de protéines membranaires sur grille augmente aussi la propension de micelles formées. C'est pourquoi, il est conseillé d'être strict sur la sélection des particules, ou alors sélectionner beaucoup de particules si la CMC est élevée. La différence entre une protéine et une micelle est facile à distinguer avec les classes 2D, ou la reconstruction *ab-initio* car les micelles vont apparaître sans forme, de petite taille et sans structures secondaires apparentes.

Enfin, l'interprétation des données cryoEM dans le cas des protéines membranaires nécessite une attention particulière sur certains points. Leurs structures possèdent une résolution assez modeste en raison de leur nature flexible, le problème de main inversé, ou l'impact de la couronne de détergent dans le moyennage des particules (présence d'artéfacts). La carte de potentiel coulombien des protéines membranaires est néanmoins riche d'informations. D'abord, la taille de cette couronne de détergent est statistiquement similaire entre les nanodisques, amphipols et détergent. Elle permet aussi de distinguer plusieurs niveaux de densités associées à un minimum commun entre particules pour la protéine et la couronne. Par contre, la résolution n'est pas suffisante dans la couronne amphipathique pour distinguer un lipide d'un détergent. Il est possible de distinguer des lipides comme cofacteurs, liés plus fortement, et donc visibles. Cela nécessite une meilleure résolution pour prouver leur nature exacte. Contrairement aux lipides, certains ligands peuvent être identifiés grâce à leur densité, comme la R6G présente dans sa poche de fixation au sein des TMDs chez BmrA. La qualité de la densité de ce ligand est très faible dû à sa nature flexible et à sa capacité d'adaptation dans la poche de fixation des ligands. Pour être sûr de la présence du ligand, plusieurs méthodes peuvent être adoptées, en utilisant la « symmetry expansion » des particules, plutôt qu'une symétrie imposée ce qui permet de visualiser cette variabilité locale. Une comparaison entre les cartes de potentiel coulombien en absence ou en présence de la molécule permet d'identifier sa densité.

Enfin, la cryoEM possède une autre capacité puissante, qui est l'analyse de la flexibilité de la protéine et l'interprétation de sa dynamique, notamment ses mouvements, dont je détaillerai dans la partie 1 du manuscrit.

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

Authors: Alexia Gobet^{1,2}, Loïck Moissonnier^{1,2}, Vincent Chaptal^{1*}

Affiliation:

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

² Authors contributed equally to the work

* To whom correspondence should be addressed

Vincent Chaptal: 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.

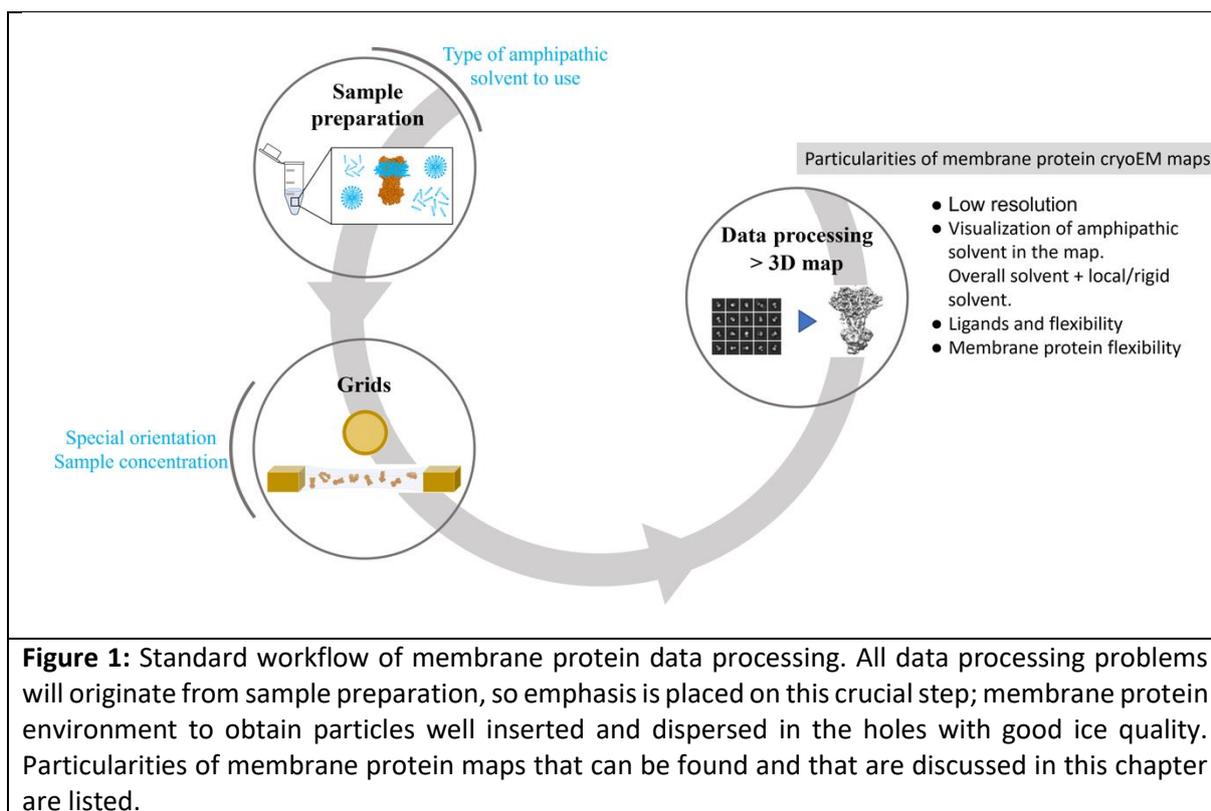
This chapter has been built on four main parts, describing 1/ practical implication on data-processing and experimental handling of membrane proteins, 2/ specificities of the processed maps, 3/ ligands in cryoEM maps, and 4/ visualizing movements captured by cryoEM.

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 utmost 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).

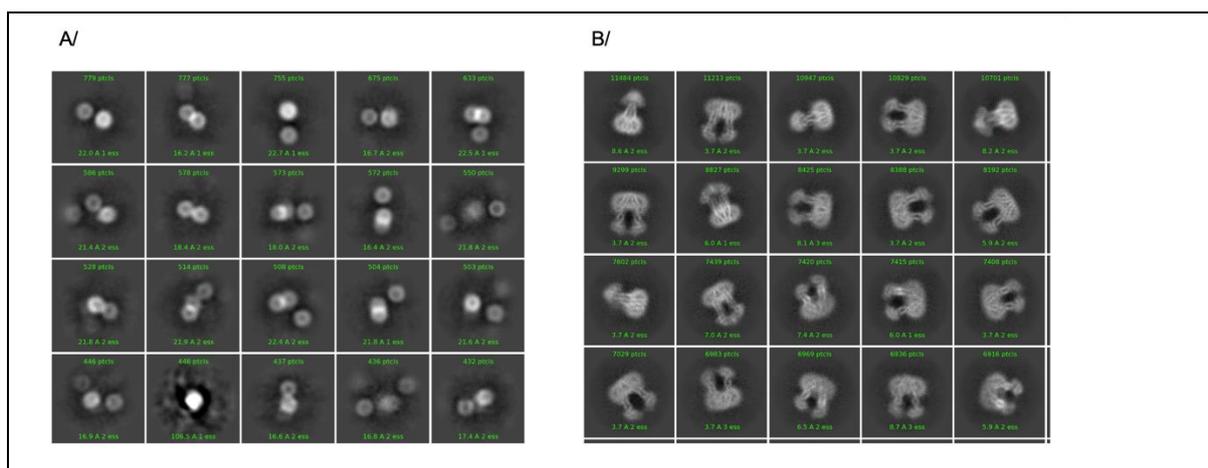


Figure 2: 2D classification of detergent micelles or membrane protein. **A/** 2D classes of detergent micelles from the DDM/Cholate mixture in the 1:1 ratio. Absence of secondary structure is noticeable along with a small size of the particles (around 50 Å diameter). **B/** 2D classes of the ABC transporter 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.

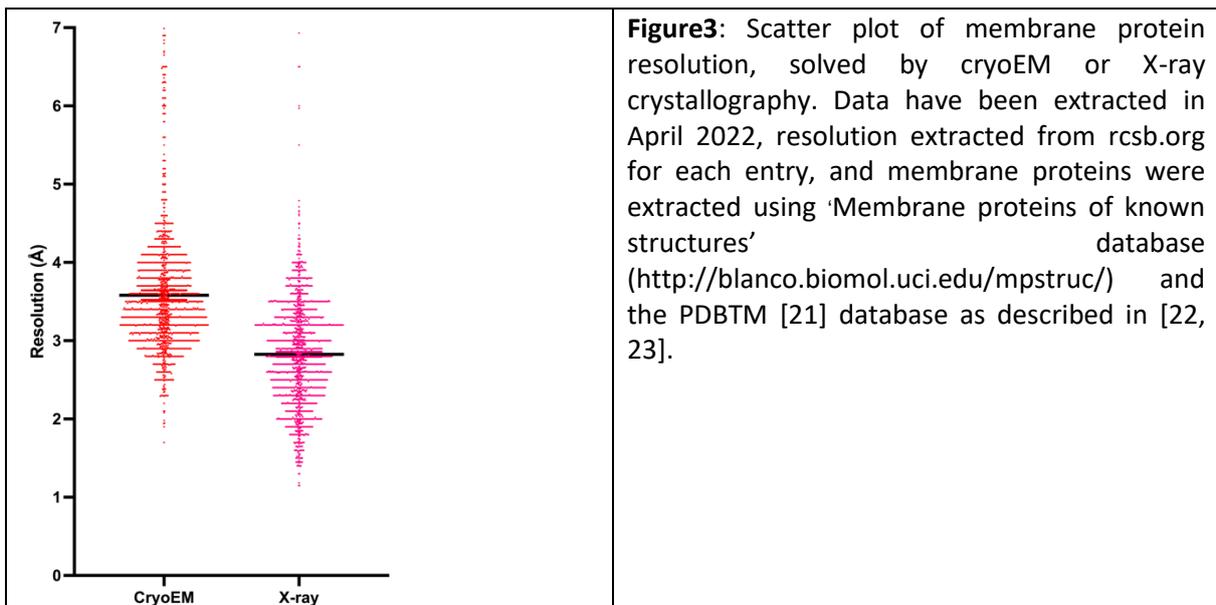
The limit at which proteins can be solved by cryoEM keeps on being pushed back to smaller and smaller proteins, so no prognostic will be made here on what would be the limit. But certainly, smaller proteins have less contrast and are thus harder to spot on micrographs, for example for screening purposes. 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) 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.

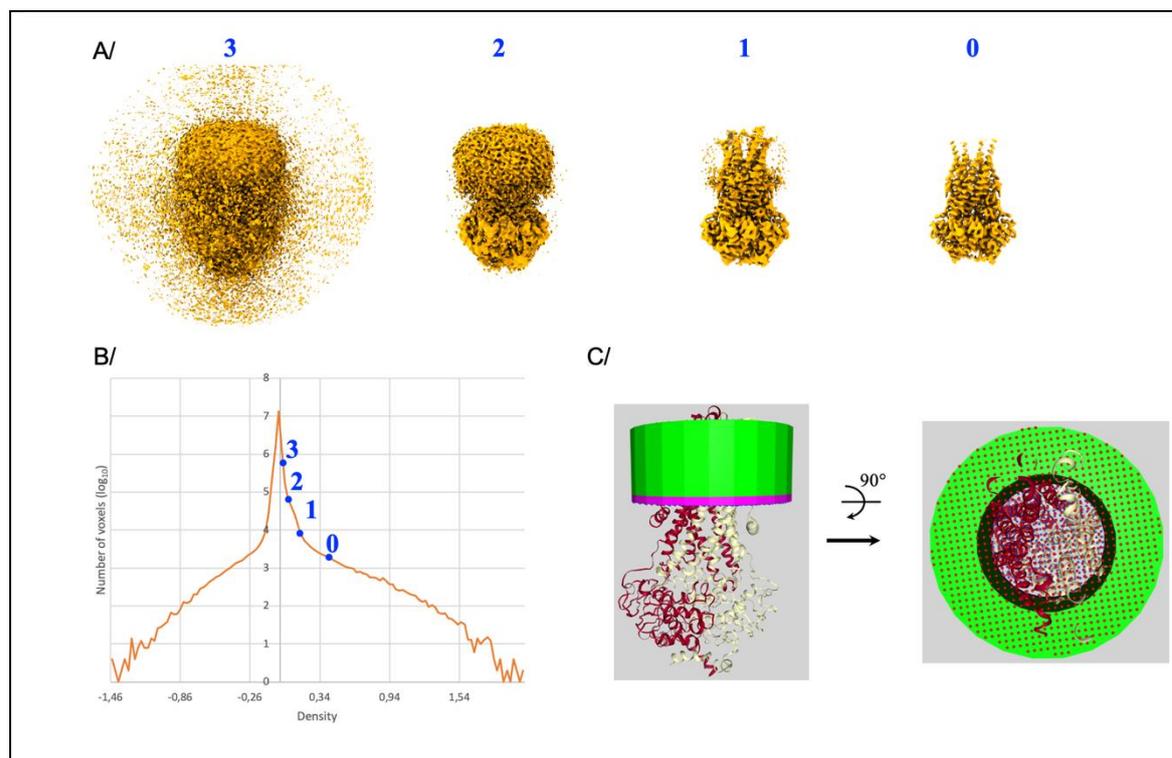


Figure 4: Visualization of amphipathic belts in cryoEM reconstructions. A/ 3D volume of the ABC transporter BmrA (EMD-12170) seen at different contour levels, which are displayed on top (blue number). These contour levels correspond to features in the map density histogram displayed in B/. C/ Correspondence 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. Tusnady, *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 Xray 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 γ -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.

1.5 Les connaissances mécanistiques sur BmrA

BmrA (*Bacillus multidrug resistance ABC*) est un exportateur de type IV, exprimé chez *Bacillus subtilis*, une bactérie à Gram positif non pathogène vivant dans le sol et le tube digestif (Earl, Losick, et Kolter 2008). Elle est fonctionnelle sous forme d'homodimère (Dalmas et al. 2005; Ravaud et al. 2006), composée de 589 résidus d'acides aminés par monomère, soit une masse moléculaire de 65 kDa. Dans un contexte biologique, BmrA est surexprimée pour lutter contre la présence de toxiques sécrétés par d'autres bactéries compétitrices du même biotope. C'est le cas avec la cervimycine C, un antibiotique sécrété par *Streptomyces tendae* (Krügel et al. 2010). Cette résistance est renforcée par l'apparition de deux mutations dans la région promotrice du gène codant pour BmrA. En effet, cela augmente l'affinité de l'ARN polymérase pour le cadre de lecture du gène codant BmrA, et double la demi-vie de l'ARNm, surexprimant ainsi la protéine. De plus, BmrA transporte des substrats de structures différentes, par exemple, elle élimine le bromure d'éthidium et est sensible à la réserpine qui stimule l'activité ATPasique (Steinfels et al. 2004). Ainsi, elle confère à *Bacillus subtilis* un phénotype de résistance à de multiples drogues (MDR). Enfin, cette protéine présente une homologie de séquence avec d'autres transporteurs comme LmrA (42 %) de *Lactococcus lactis*, MsbA d'*E. coli* ou bien la P-gp des mammifères (Steinfels et al. 2002).

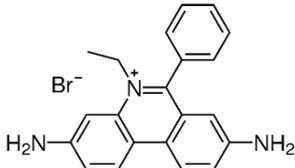
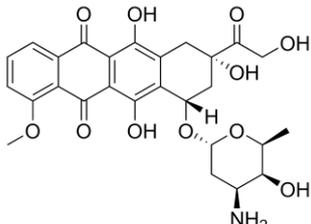
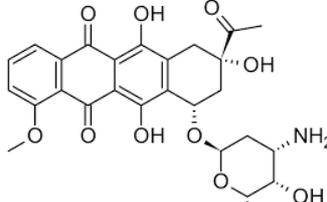
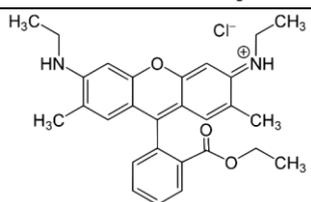
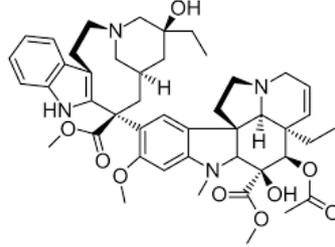
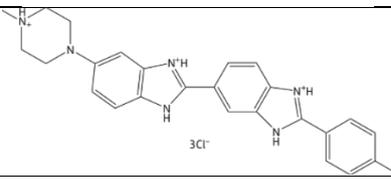
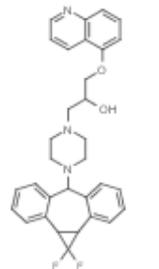
- Caractéristiques fonctionnelles :

BmrA peut être exprimée en grande quantité dans la souche C41(DE3) d'*E. coli*, pouvant atteindre plus de 50 % des protéines membranaires (Steinfels et al. 2002). Plusieurs optimisations au niveau du protocole d'expression, de purification, ainsi que le choix du détergent, ont été effectués pour permettre une analyse fonctionnelle et structurale de BmrA (Chaptal et al. 2017; Matar-Merheb et al. 2011; Ravaud et al. 2006; Wiseman et al. 2014) afin d'élucider son mécanisme.

BmrA possède une activité basale d'hydrolyse de l'ATP assez élevée en détergent, de l'ordre de la $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, qui reste néanmoins fortement modulée par le type d'environnement amphipathique. Par exemple, son activité varie de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en DDM à plus de 6 fois reconstitué en liposomes (Steinfels et al. 2004). Afin de comprendre le fonctionnement des NBDs, une large utilisation de mutants et d'analogues d'ATP a permis d'éclaircir certains points sur la fixation et l'hydrolyse d'ATP (Lacabanne et al. 2019). En particulier, le glutamate 504 a été identifié comme la base catalytique car sa mutation en alanine ou glutamine préserve la fixation mais pas l'hydrolyse de l'ATP (Orelle et al. 2003). D'autres mutants ont mis en évidence le rôle de certains résidus dans le cycle catalytique et le transport de substrat comme le glutamate 474 de la X-loop impliqué dans le couplage entre l'activité ATPasique et le transport de substrat, ou encore la lysine 380 dans le Walker A impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP. L'emploi d'analogues d'ATP ou des inhibiteurs a permis de décomposer le cycle catalytique de BmrA en favorisant certains états, soit pré-hydrolytique (ATP- γ -S, AMPPNP, ADP :BeF_x), de transition (AlF₄, vanadate), ou post-hydrolytique (ADP :SO₄²⁻) (Lacabanne et al. 2020). Ceci a été exploité pour déterminer les différents états conformationnels adoptés par BmrA à l'aide du SANS et HDX-MS (Javed et al. 2022).

De plus, BmrA lie différents types de substrats, avec une affinité de l'ordre du μM , listés dans le tableau 1 (Steinfels et al. 2004). Les constantes ont été calculées à partir de tests de fixation

des substrats en utilisant l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de BmrA. Le transport par BmrA de ces molécules a été aussi mis en évidence dans des vésicules de membranes inversées.

Substrats	Structures	K_D (μM)
Bromure d'éthidium		$10,6 \pm 3$
Doxorubicine		$22,1 \pm 4,5$
Daunomycine		$12,2 \pm 3,5$
Rhodamine 6G		$22,4 \pm 5,1$
Rhodamine 6G (*)		$12,9 \pm 3$ $6,4 \pm 1,7$
Vinblastine		$5 \pm 1,1$
Hoechst 33342		$9,5 \pm 2,3$
LY 335979		$4,4 \pm 0,7$

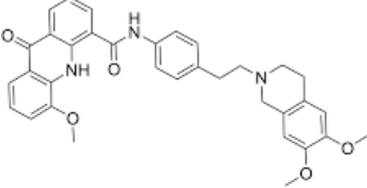
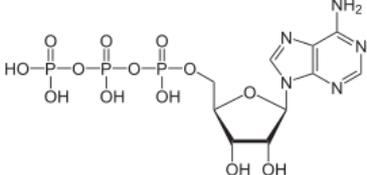
GF 120918X		$0,44 \pm 0,02$
ATP-Mg ²⁺ (**)		150 ± 33 $70 \pm 8 (K_{0,5})$

Tableau 1 : Tableau réunissant les constantes d'affinité de BmrA en détergent (DDM) pour plusieurs substrats à l'aide de sa fluorescence intrinsèque.

Les données ont été récupérées de (Chaptal et al. 2022; Steinfels et al. 2004) . (*) Valeurs obtenues pour BmrA-E504A en DDM-cholate en absence et en présence de 5 mM d'ATP. (**) Valeurs obtenues pour BmrA-E504A en DDM-cholate en absence et en présence de 100 μ M de R6G.

- Caractéristiques structurales :

Malgré ces nombreuses études biochimiques, certains points mécanistiques restent flous. Afin de répondre à ces questions, l'intérêt d'obtenir des structures de BmrA était devenue indispensable. La première tentative d'observer la structure de BmrA a été faite par l'équipe de Jean-Michel Jault en collaboration avec l'équipe de Daniel Levy, en remplaçant le détergent par des phospholipides (Chami et al. 2002; Fribourg et al. 2014). BmrA a été observé sous forme d'anneaux contenant 24 ou plus de dimères de BmrA, représentés dans la figure 16. Malgré une résolution d'environ 25 Å, la forme en V de BmrA dans la conformation IF est facilement identifiable. Ils ont aussi constaté par coloration négative des différences d'ouverture des NBDs dues à la nature flexible de BmrA sous forme apo. L'ajout d'ATP détruit ces roulettes car la conformation OF déstabilise l'assemblage avec l'ouverture des TMDs. Ceci est une autre indication de l'influence de l'ATP comme guide des changements conformationnels de BmrA.

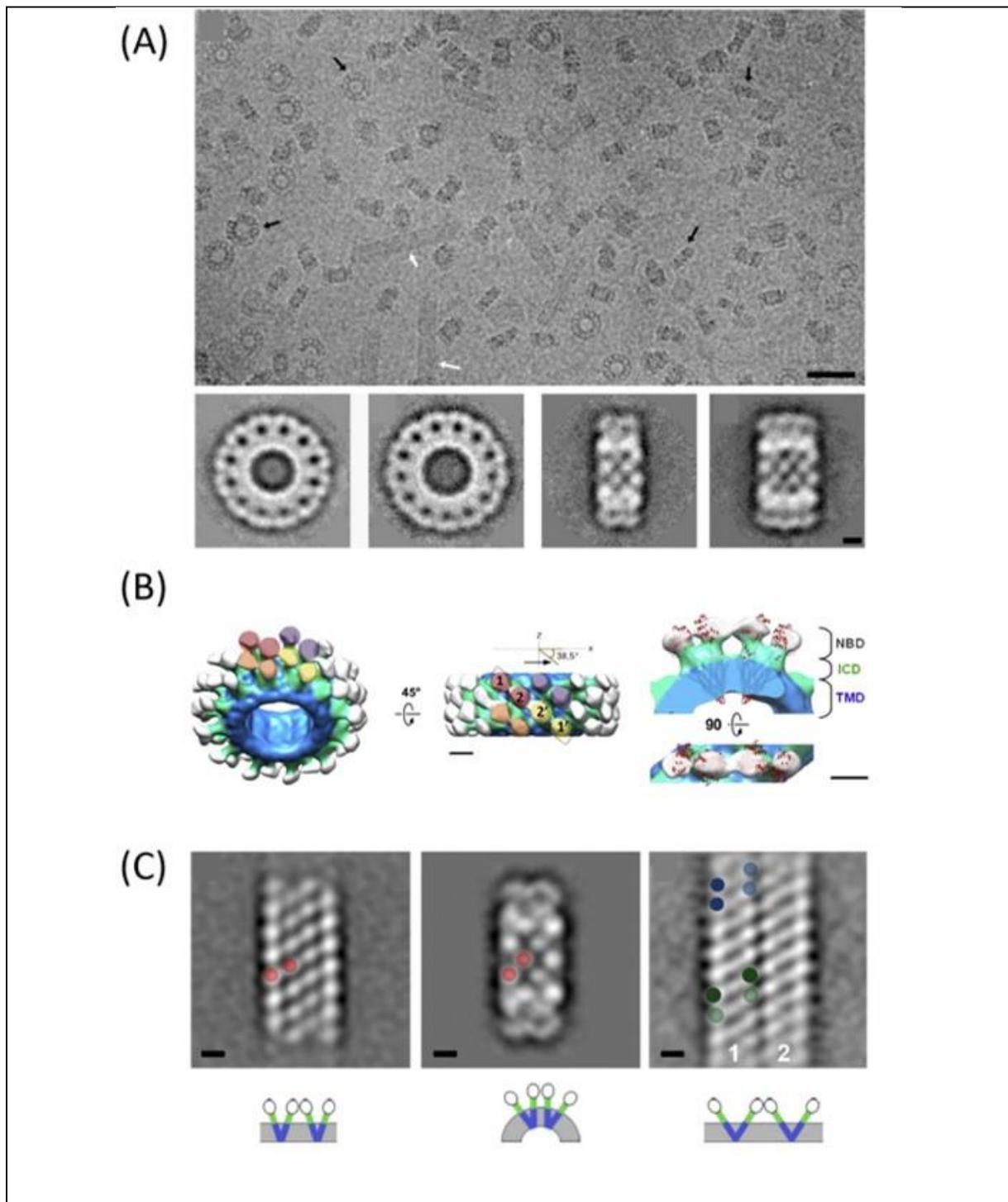


Figure 16 : Micrographes et modèles 3D des roulettes de BmrA en conformation IF avec différentes ouvertures des NBDs

(A) Micrographie montrant des particules de roulettes contenant BmrA (échelle : 25 nm). En dessous du micrographie, il est représenté les quatre principales classes 2D (échelle 5 nm).

(B) Modèles 3D selon une symétrie d12. La structure de P-gp (PDB : 3G5U) a été utilisé pour un docking dans la densité représentant la conformation IF.

(C) Différents arrangements possibles des NBDs (échelle 5 nm).

Les figures sont issues de (Fribourg et al. 2014).

D'autres structures sont présentes dans la PDB avec une meilleure résolution en détergent, obtenus par cristallographie aux rayons X et cryoEM. La figure 17 rassemble l'ensemble des structures qui sont soit en conformation IF ou OF, en absence ou en présence d'ATP. Par ailleurs, la structure de BmrA (7BG4) en présence de ligand, R6G, a été la première parmi les transporteurs ABC à être résolue. À priori, ce sont des structures statiques donnant des informations limitées sur le fonctionnement de la protéine. Néanmoins, la superposition des structures en OF dans différentes conditions a permis de mettre en évidence sa flexibilité au niveau de la boucle TM1-2, confirmée par HDX-MS (Chaptal et al. 2022). En effet, cette boucle bouge selon un mouvement d'éventail, que la R6G stabilise en forme fermée. Au cours de cette étude, les simulations de dynamique moléculaire ont aussi montré une fermeture rapide des TMDs, après le départ de la R6G, à cause de l'exposition des résidus hydrophobes de la cavité des substrats au sein des TMDs.

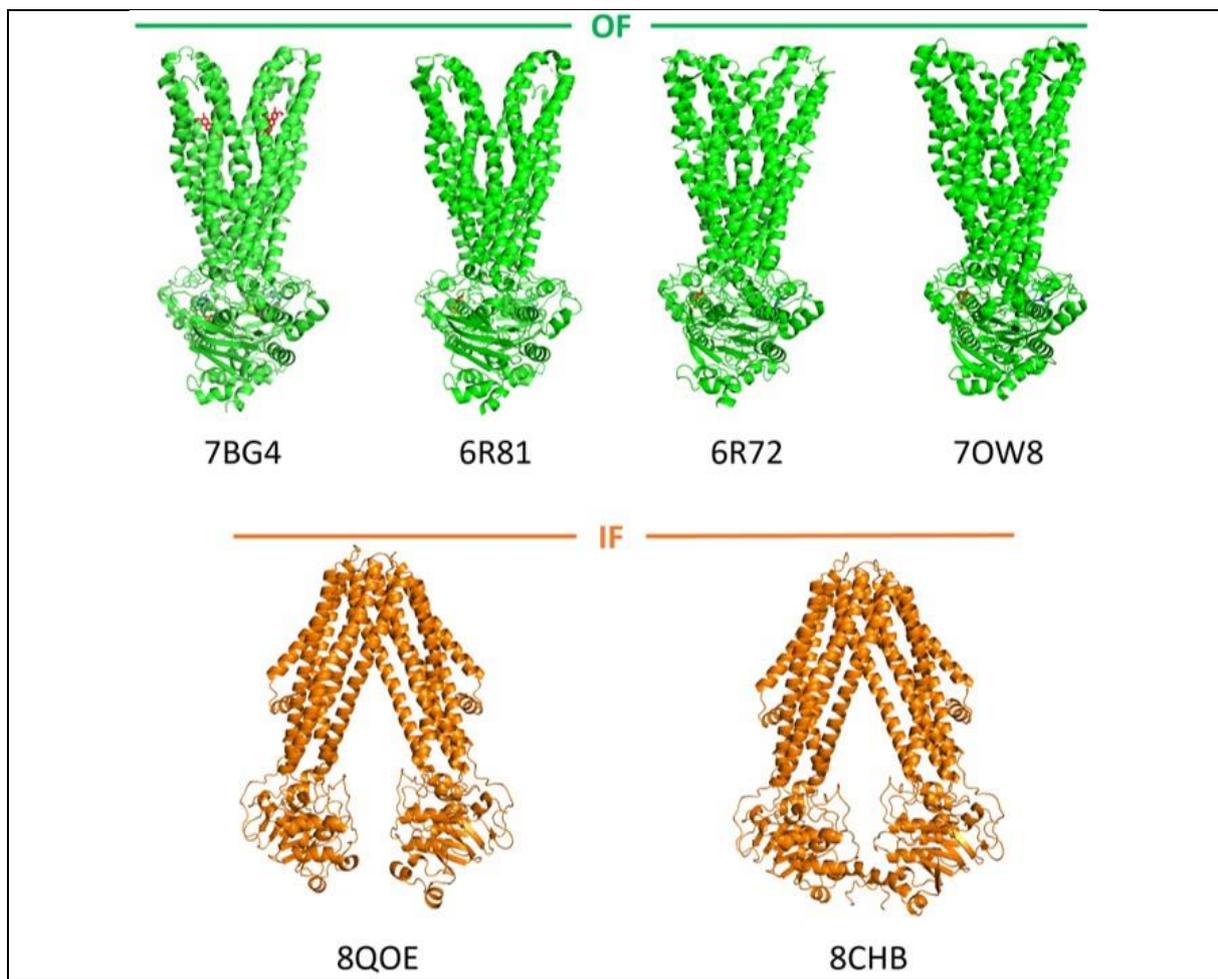


Figure 17 : Structures 3D résolues de BmrA

7BG4 : BmrA-E504A en DDM-cholate avec 100 μM de R6G et 5 mM d'ATP-Mg²⁺ (cryoEM) ; 6R81 : BmrA-E504A en DDM-cholate avec 5 mM d'ATP-Mg²⁺ (cryoEM) ; 6R72 : BmrA-E504A en DDM-cholate avec 5 mM d'ATP-Mg²⁺ (cristallographie aux rayons X) ; 7OW8 : BmrA-E504A en DDM-cholate avec 5 mM d'ATP-Mg²⁺ (cryoEM) ; 8QOE : BmrA-WT en DDM-cholate (cryoEM) ; 8CHB : BmrA-WT en DDM-cholate avec un pont disulfure entre C436S-A582C (cryoEM).

D'autres études structurales complémentaires comme les techniques de RMN du solide ou EPR ont été utilisées. Dans le cas de la RMN du solide, les analyses ont confirmé que le passage en OF ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP, et que le dimère de NBDs adopte une asymétrie des sites de fixation de l'ATP (Lacabanne et al. 2022). L'ensemble de ces données a amené à proposer plusieurs modèles détaillant certains processus du cycle catalytique et de transport, représenté dans la figure 18. Le premier met en valeur la plasticité de BmrA, qui lui permet au cours du transport de lier le substrat face cytoplasmique et le relarguer face extracellulaire. Le phénomène de fermeture dû à l'hydrophobicité (« hydrophobic collapse ») à l'apex du transporteur gouverne sa fermeture du côté extérieur pour permettre le retour à une conformation IF à l'aide de l'énergie de l'hydrolyse d'ATP (Chaptal et al. 2022). Durant ce transport, les NBDs pourraient fonctionner de façon asymétrique au cours de l'hydrolyse de l'ATP, et le modèle du cycle catalytique de BmrA serait un mélange des modèles « Processive clamp » et « Alternating site » (Lacabanne et al. 2022). Le dernier modèle propose une fermeture des NBDs selon un mouvement translationnel de type « tweezer-like » avec la possibilité d'une large ouverture de BmrA en IF pour prendre en charge des substrats de grande taille (Di Cesare et al. 2024). Cependant, certains points restent à éclaircir, notamment sur la communication entre les NBDs et TMDs au cours du transport, la cinétique des différentes étapes, en particulier, la stœchiométrie entre la consommation d'ATP et le nombre de substrats transportés pour avoir une description complète du mécanisme de BmrA.

En résumé, BmrA est une des protéines membranaires archétypes des exportateurs de type IV, largement utilisée afin d'élucider le mécanisme de résistance à l'aide de techniques biochimiques, biophysiques et structurales. Cependant, son fonctionnement et son rôle dans un contexte physiologique nécessitent d'autres études. Certaines études biophysiques (smFRET, EPR, HDX-MS) ont été réalisées dans différents environnements pour comprendre sa biomécanique (Damm 2019; Damm et al. 2024; Ding et al. 2011; Do Cao et al. 2009).

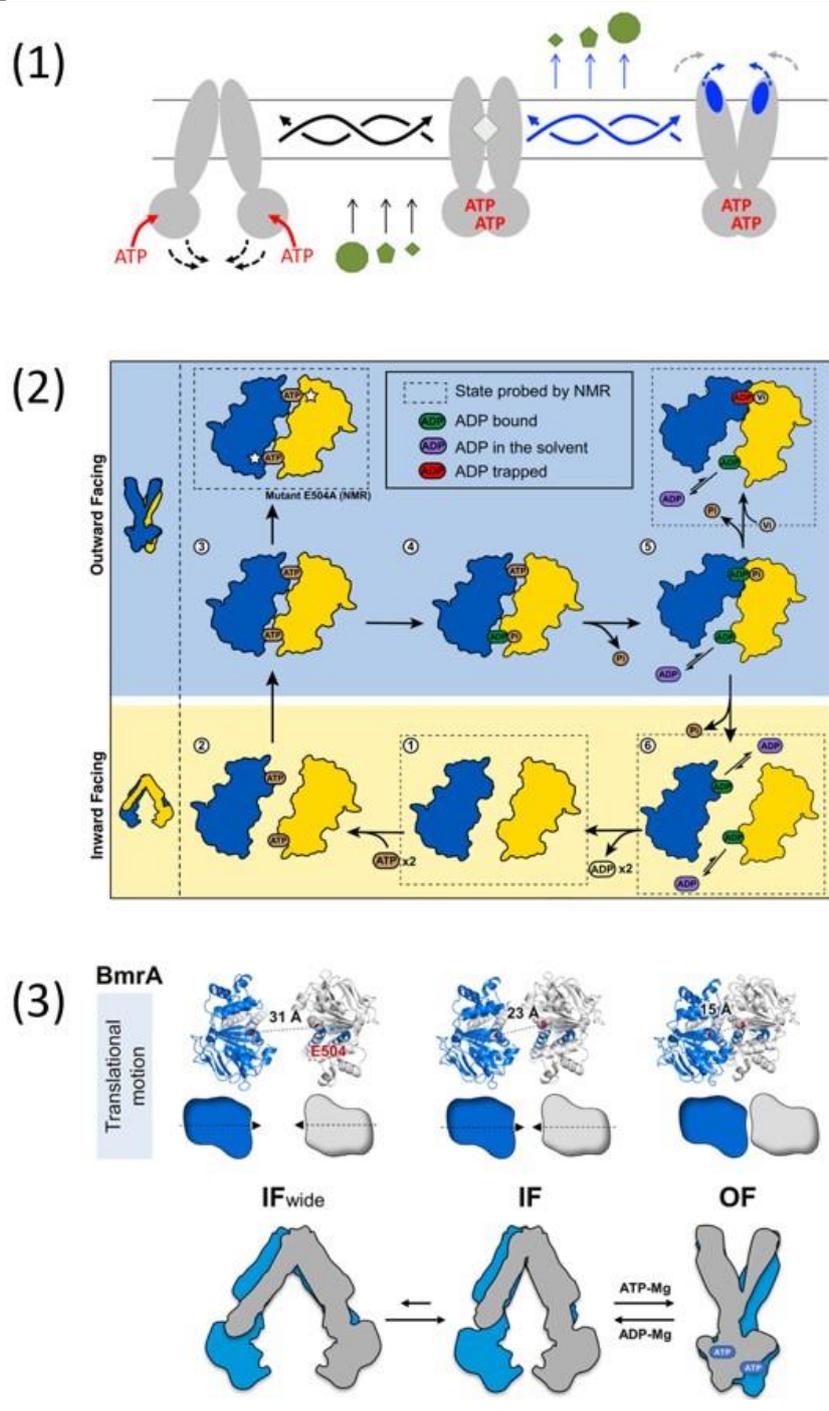


Figure 18 : Les modèles mécanistiques proposés sur l'efflux de substrat et le fonctionnement des NBDs chez BmrA

- (1) Illustration issue de (Chaptal et al. 2022).
- (2) Illustration issue de (Lacabanne et al. 2022).
- (3) Illustration issue de (Di Cesare et al. 2024).

2 Problématique et objectifs de ma thèse

Le but principal de mon projet de thèse a été d'étudier la biomécanique du transporteurs BmrA. Lors de mon arrivée, l'équipe avait déterminé les conditions de production et de purification d'un échantillon homogène et concentré pour des études cristallographiques aux rayons X puis par cryoEM. Ces structures statiques ont permis de caractériser d'un point de vue structural BmrA en présence de substrats et/ou de ligands dans la conformation OF. Il s'agissait des thèses d'Arnaud Kilburg, Véronica Zampieri, et Alexia Gobet. J'ai rejoint ce projet pour y apporter une caractérisation fonctionnelle par cryoEM, résoudre la structure en présence de Hœchst 33342, et initier celle avec la doxorubicine.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressé à caractériser le mécanisme de BmrA à l'aide de techniques biochimiques et structurales en temps résolu. La partie 2 du manuscrit est consacrée à faire varier le paramètre temps pour acquérir des informations cinétiques et dynamiques de la protéine. J'ai mis au point les techniques pour suivre les changements conformationnels en fonction du temps. A partir de ces données, j'ai réalisé par cryoEM une caractérisation des transitions conformationnelles à des temps donnés. Par ailleurs, j'ai aussi fait une analyse enzymologique de ces changements pour en déterminer les paramètres cinétiques ; en effet, bien qu'essentiels à la compréhension de la dynamique des transporteurs ABC, il y a jusque-là peu d'information de ce type.

Enfin, dans une troisième partie, je me suis aussi intéressé à résoudre la structure de BmrA dans un environnement lipidique. Pour cela, j'ai testé et optimisé un protocole de reconstitution de BmrA en liposome.

3 Partie 1 : Etude mécanistique de BmrA en état stationnaire

3.1 Mise en contexte

L'équipe a commencé par déterminer la structure 3D de BmrA par cristallographie aux rayons X, mais ils ont rencontré certaines difficultés avec la forme sauvage car elle formait des agrégats au moment d'être concentrée. Afin de pallier ce problème, l'équipe a utilisé un mutant inactif (E504A) pour bloquer BmrA dans la conformation OF en présence d'ATP. Néanmoins, l'obtention de cristaux était une étape délicate. Une nouvelle façon d'extraire et de purifier BmrA a été utilisée, mise au point pour la P-gp par l'équipe Chang en utilisant le Triton X-100 puis un mélange de DDM-cholate (Ward et al. 2013), a permis d'obtenir des cristaux de BmrA diffractant à 8 Å. Plusieurs optimisations ont été réalisées par la suite jusqu'à obtenir des cristaux de BmrA en présence d'ATP-Mg²⁺ qui diffractaient à 4 Å et avec lesquels il fut possible de résoudre la structure correspondante. L'équipe a aussi collaboré avec celle du Pr. Martin Högbom à Stockholm pour obtenir la structure de BmrA avec l'ATP-Mg²⁺ et R6G par cryoEM. Cette dernière est la première structure d'un transporteur ABC en conformation OF en présence d'un ligand, ici la R6G dans sa poche de fixation. De nombreuses conclusions et hypothèses ont permis à l'équipe d'étudier la plasticité de BmrA avec ces ligands et de proposer un modèle d'efflux (Chaptal et al. 2022).

L'équipe a voulu acquérir la structure de BmrA en conformation IF avec le même mutant dans les mêmes conditions sans ATP. De plus, ce mutant possède une propriété intrinsèque importante car il permet d'avoir une transition dirigée de la conformation IF vers OF en présence d'ATP, sans retour en arrière car il ne peut plus catalyser l'hydrolyse de l'ATP. C'est pourquoi l'équipe a voulu caractériser biochimiquement et structuralement cette transition. Ainsi, l'article propose une approche d'enzymologie structurale en état stationnaire pour détailler le mécanisme de plasticité de BmrA en présence de ces substrats au cours cette transition.

De plus, afin de pouvoir étudier complètement la variabilité conformationnelle, nous avons développé un outil pour analyser la variabilité des particules de BmrA dans ces conditions au niveau de sa structure 3D, « variability refinement » disponible dans Phenix.

Je développerai les points majeurs de ces articles dont je suis co-premier et deuxième auteur. Ils apportent de nouvelles informations sur ce transporteur ainsi qu'une nouvelle perspective pour l'étudier. L'article est actuellement en révision à Nature Communications. Je vais détailler ci-dessous la première version de l'article, décrire la nouvelle structure et ce qu'elle apporte.

3.2 Points majeurs des articles

J'ai participé dans un premier temps à toute l'étude biochimique du premier article. J'ai notamment résolu une nouvelle structure en complexe avec le Hoechst 33342 ainsi que l'analyse de sa variabilité conformationnelle.

L'étude a été effectuée sur un mutant inactif de BmrA. Le résidu muté est le glutamate 504 qui appartient au motif Walker B (Orelle et al. 2003). La mutation en alanine n'empêche pas l'ATP de se lier aux deux sites mais ne permet plus de déprotoner la molécule d'eau qui attaque le groupement phosphate γ de l'ATP ce qui permet d'étudier la transition de la conformation IF vers OF.

Le premier point a été d'étudier la fixation de l'ATP à l'aide de la fluorescence intrinsèque du mutant. En absence de ligand, la saturation des sites d'ATP suit une courbe hyperbolique ce qui traduit une saturation des 2 sites selon un mode michaelien. En présence de R6G la courbe de fixation d'ATP devient sigmoïdale avec un coefficient de Hill supérieur à 3. D'autres ligands (Hoechst 33342, doxorubicine, vincristine) induisent aussi ce même type de courbe pour la fixation de l'ATP. Ainsi, la fixation de deux substrats différents (l'ATP est le substrat et la R6G est l'effecteur) à des endroits distincts de BmrA, affectant aussi l'affinité pour l'ATP, est caractéristique d'un comportement allostérique. Néanmoins, la symétrie au sein des NBDs de BmrA est conservée et les NBS sont identiques en absence de ligand. Ils semblent devenir transitoirement asymétriques, car le ligand va induire une coopérativité dans la fixation de l'ATP. Afin de mieux caractériser ce comportement, Alexia Gobet (ancienne doctorante de l'équipe) a résolu et analysé plusieurs structures obtenues en absence ou en présence de R6G à une concentration fixe de 100 μ M, en variant la concentration d'ATP. La figure 19 montre les différentes proportions d'espèces IF et OF en fonction des conditions définies par le test de fixation.

En absence d'ATP et avec ou sans R6G, 100% de particules de BmrA est en conformation IF. En présence d'une concentration saturante d'ATP (5 mM) BmrA adopte au contraire une conformation OF. En absence de R6G et avec une concentration équimolaire d'ATP (c'est-à-dire 1 mole d'ATP pour 1 mole de dimère de BmrA), l'ensemble des particules est en conformation IF, aboutissant à une structure à haute résolution ainsi qu'à trois autres à plus faible résolution. Ces dernières illustrent la nature dynamique de BmrA et le fait que la formation d'un seul site n'est pas favorable à la dimérisation des NBDs. En présence de R6G et d'ATP, il y a cette fois-ci deux conformations distinctes avec 75 % en conformation IF et 25 % en conformation OF. À la moitié de l'atténuation de fluorescence (c'est-à-dire proche du K_D en absence de R6G et du $K_{0.5}$ avec), la distribution des particules entre IF et OF sont quasi-équivalentes dans les deux conditions. Toutefois, les particules sont légèrement plus nombreuses en conformation OF en présence de R6G avec une concentration d'ATP plus faible. Ainsi, le comportement allostérique induit par la R6G permet un changement de population plus efficace de la conformation IF vers OF à des concentrations plus faibles d'ATP qu'en absence de R6G.

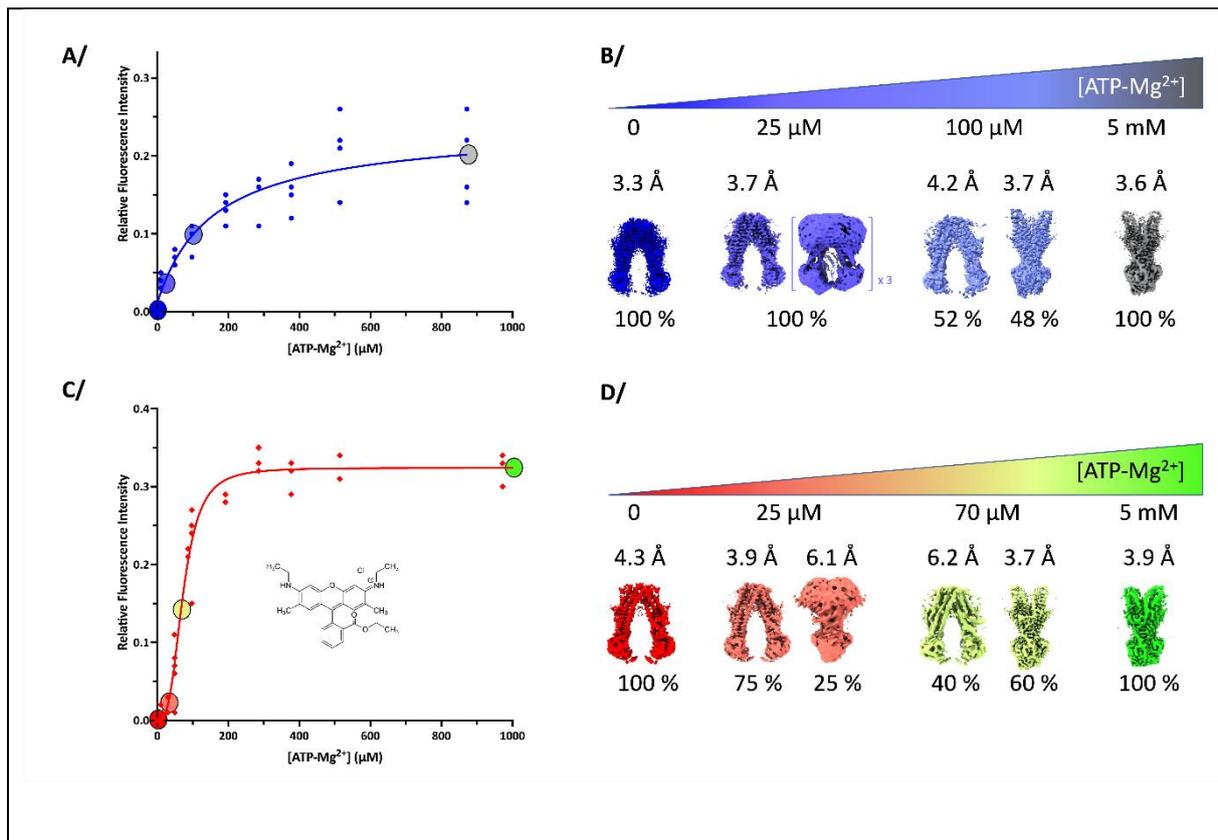


Figure 19 : Fixation de l'ATP sur BmrA en absence ou en présence de R6G et les structures 3D des différentes conformations IF/OF

A/ Fixation michaelienne d'ATP en absence de R6G. Les cartes de densité électronique acquises par cryoEM sont sur le panneau B/ avec une couleur associée à chaque condition représentée par un rond de la même couleur. Par exemple, le rond gris sur la courbe est associé à la structure grise avec 100 % de conformation OF à 5 mM d'ATP-Mg²⁺.

C/ Fixation coopérative d'ATP en présence de R6G (100 μM). Les cartes de densité électronique acquises par cryoEM sont sur le panneau D/ avec une couleur associée à chaque condition représentée par un rond de la même couleur.

L'intensité de fluorescence relative correspond à l'intensité de fluorescence intrinsèque de BmrA à 330 nm corrigé de l'intensité de fluorescence du NATA.

Le pourcentage pour chaque structure a été déterminé à partir du nombre de particules obtenus pour chaque modèle *ab initio* par rapport au nombre total de particules sélectionnées.

Une analyse de ces structures 3D permet d'expliquer le changement de population IF et OF en fonction de la concentration d'ATP. En effet, la superposition de ces structures (Figure 20), sous forme apo et en présence de R6G, montre un réarrangement des hélices transmembranaires (écartement de 5 Å) qui est amplifié au niveau des hélices couplantes (écartement de 10 Å). L'effet est encore plus net au niveau des deux NBDs (écartement de 20 Å) avec une réorientation les disposant en face l'un de l'autre. De plus, cette superposition montre aussi les conformations extrêmes adoptées par BmrA, en absence ou en présence du ligand. Dans le cas des structures OF, la fixation de la R6G favorise la fermeture de la boucle entre les hélices TM1 et TM2, ce qui a été déjà caractérisé auparavant par l'équipe (Chaptal et al. 2022). Ainsi, la superposition de ces structures a permis de montrer la flexibilité de BmrA à différents endroits et dans ses deux conformations extrêmes.

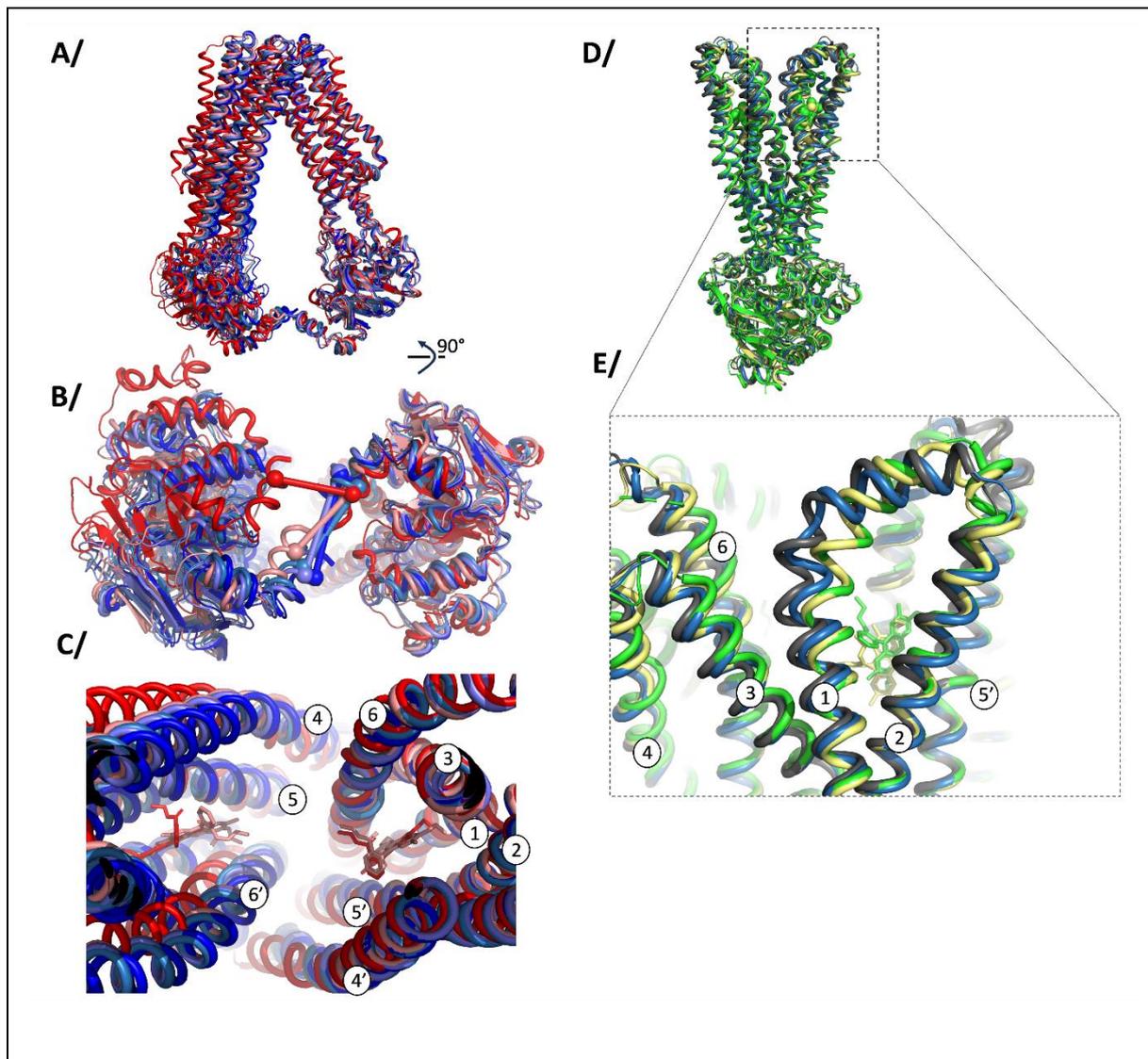


Figure 20 : Superposition des structures en conformation IF ou OF en absence ou en présence de R6G

A/, B/ et C/ Superposition des structures de BmrA en conformation IF dans les conditions : apo (bleu), 25 μM d'ATP-Mg²⁺ sans R6G (cyan), R6G sans ATP (rouge), et 25 μM d'ATP-Mg²⁺ avec R6G (rose pâle). B/ est une vue de dessous des NBDs et C/ est une vue dans les TMDs au niveau de la poche de fixation de la R6G. La superposition a été réalisée sur les 3 premières hélices transmembranaires de la chaîne A (du résidu 1 à 161).

D/ et E/ Superposition des structures de BmrA en conformation OF dans les conditions : 100 μM d'ATP-Mg²⁺ sans R6G (bleu), 5 mM d'ATP-Mg²⁺ sans R6G (gris), 70 μM d'ATP-Mg²⁺ avec R6G (jaune), et 5 mM d'ATP-Mg²⁺ avec R6G (vert). E/ Zoom sur les hélices TM1 et TM2. La superposition a été réalisée sur les 4 dernières hélices transmembranaires de la chaîne A (du résidu 104 à 300).

La cryoEM ne permet pas seulement d'obtenir des structures 3D statiques à haute résolution mais elle offre la capacité d'exploiter la variabilité entre les particules déposées sur grille et la visualiser. En effet, l'échantillon possède une hétérogénéité continue due à des mouvements locaux de la protéine avant sa congélation. Des algorithmes ont été récemment développés pour l'analyser, comme HEMMNA, 3DVA, 3Dflex, ou cryoDRGN (Tang et al. 2023). Durant cette étude, nous avons utilisé le logiciel cryoSPARC avec l'outil 3DVA qui calcule la variance entre

particules puis réalise une analyse selon un mode linéaire dans composante principale (PCA). Le choix de la linéarité simplifie les calculs tout en apportant une vision des mouvements au sein de BmrA ; en outre, l'étude peut être complétée en analysant selon le même principe d'autres composantes secondaires pour isoler des mouvements plus discrets. Alexia Gobet a optimisé les paramètres pour étudier cette variabilité 3D sur les jeux de données de la forme apo et en présence de R6G dans la conformation IF, sans ATP. Cet outil a généré un ensemble de 20 cartes de densité représentant un continuum de conformations discrètes, visualisables indépendamment et sous forme d'animation. Cependant, l'interprétation des données peut être délicate en raison de la labilité de certaines densités localement, et du niveau de précision des images. C'est pourquoi, l'équipe a développé un outil, « *varref* », disponible sur Phenix permettant de générer des modèles moléculaires à partir de ces cartes de densités et en utilisant le modèle à haute résolution (cf. paragraphe 3.5).

Les variances inter-particules sont représentées dans un espace dit latent, qui permet de visualiser en utilisant une analyse par composante principale, les grandes variations des particules par rapport à l'empreinte (« mask ») de la reconstruction à haute résolution. La distribution gaussienne de cet espace par composante principale pour BmrA nous a permis d'en faire une analyse linéaire pour décomposer les mouvements. Il en résulte des mouvements élémentaires qui permettent de simplifier et décomposer les mouvements de la protéine. L'observation par 3DVA (cryoSPARC) puis *varref* (Phenix) révèle des translations et des rotations locales, décomposées dans chaque composante. Dans la figure 21, les flèches indiquent le mouvement principal. Si on prend l'exemple de la composante (principale) 0 de BmrA sans ligand, on remarque que la valine 363 dans son feuillet β est immobile et peut donc servir de point fixe. L'hélice contenant la lysine 462 opère une translation horizontale de 5,4 Å tandis que l'hélice C-terminale opère une translation verticale de 6,2 Å. La combinaison des deux produit une rotation de 12° du NBD par rapport au point fixe. De même, cette rotation est accompagnée d'un mouvement de translation de l'hélice TM4 de 2,5 Å. La communication entre les TMDs et les NBDs semble évidente car une faible amplitude des hélices transmembranaires se traduit par des mouvements plus importants au sein des NBDs. Dans les autres composantes, on observe une rotation du NBD de 16° dans un sens différent de celui observé dans la composante 0 tandis que la composante 2 montre une translation des NBDs. En présence de R6G, on observe les mêmes types de mouvements mais l'amplitude de ces derniers est réduite pour les composantes 1 et 2. Par contre, il manque des informations pour déterminer avec exactitude l'effet produit par le ligand sur l'hélice transmembranaires et répercuté sur les NBDs.

En résumé, cette analyse montre que les NBDs explorent un large espace conformationnel à la fois par rotation et translation. La présence de la R6G stabilise les NBDs ce qui réduit les mouvements et empêche leur rapprochement direct. La seule possibilité, pour que les NBDs se ferment en présence d'ATP est de générer un premier NBS sur le côté, créant l'asymétrie observée sous forme d'allostérie avec les tests de fixation. Ainsi, le premier NBS créé favorise la formation du deuxième NBS. Les simulations de dynamique moléculaire apportent les mêmes conclusions par rapport à l'exploration réduite de l'espace conformationnel des NBDs en présence de R6G.

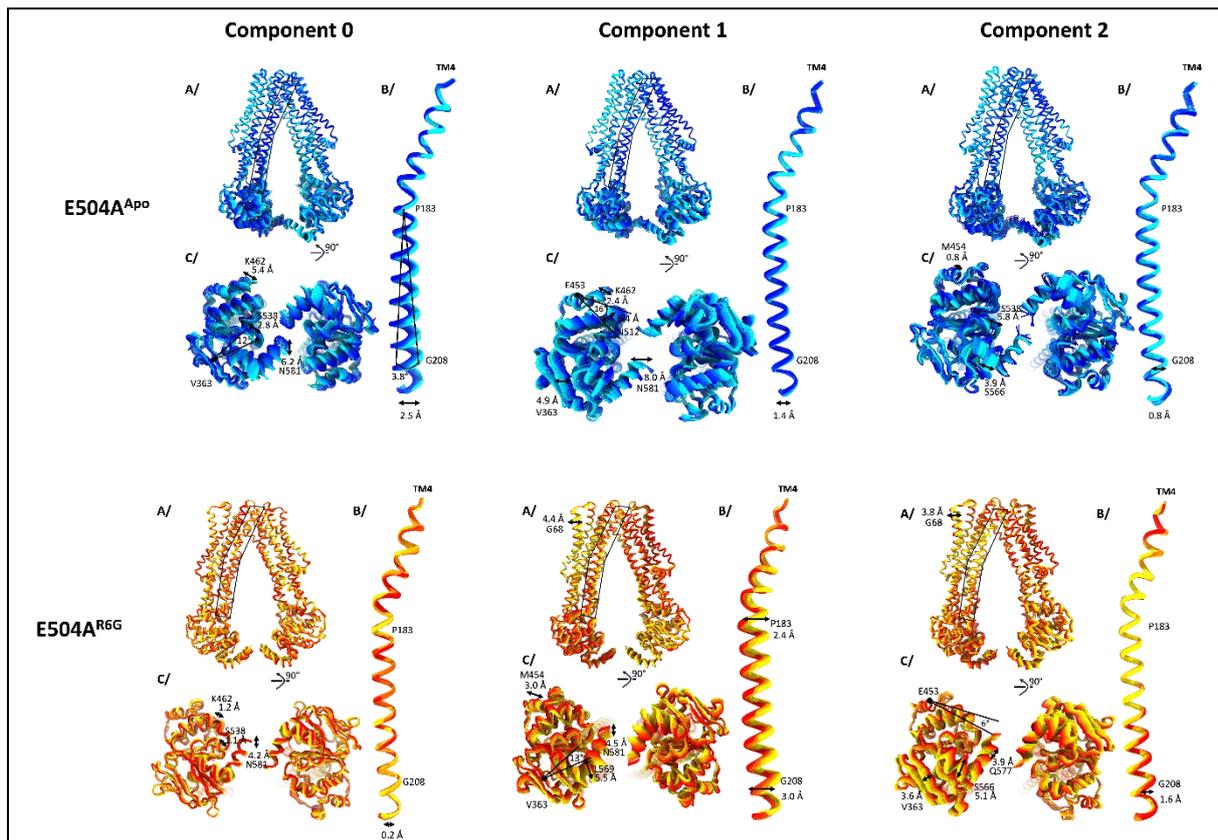


Figure 21 : Variabilité 3D de BmrA-E504A sous forme apo ou en présence de R6G
 E504A^{apo} est la condition apo et E504A^{R6G} est la condition avec R6G sans ATP, avec un gradient de couleur clair à foncé qui représente les 20 modèles affinés dans les 20 cartes de densités générées par 3DVA. A/ Ensemble des modèles de BmrA, B/ Représentation de l'hélice TM4, et C/ Vue de dessous des modèles des NBDs. Chaque mouvement est décomposé en 3 composantes principales et les flèches indiquent le sens des mouvements.

Au cours de cette étude, il est légitime de se poser la question si d'autres ligands comme le Hœchst 33342, la doxorubicine, ou la vincristine qui induisent le même comportement coopératif de la fixation d'ATP, génère un spectre conformationnel équivalent. Pour répondre à cette question, j'ai incubé BmrA en présence de 100 μ M d'Hœchst 33342 sans ATP pour le déposer sur grille cryoEM. J'ai collecté 9915 movies ce qui a donné après traitement, une classe conformationnelle unique IF de BmrA avec 669 000 particules (Figure 22). La résolution globale et finale pour cette structure 3D est de 3,6 Å. Par ailleurs, deux densités dans la région transmembranaire au niveau de la poche de fixation ont pu être identifiées comme des molécules d'Hœchst 33342. Par contre, d'après leur superpositions, cette structure se rapproche de celle sous forme apo.

Nous avons voulu voir l'impact du Hœchst sur la variabilité des particules. Pour cela, nous avons utilisé l'outil 3DVA et la structure 3D de BmrA en présence de ce ligand, avec un filtre de résolution à 4,5 Å. La distribution des particules est gaussienne, du même type que les données en présence de R6G. Les modèles ont été affinés par le logiciel *varref* et leur analyse (Figure 23) montre un mouvement des hélices transmembranaires et des NBDs légèrement différent de ceux observés avec les formes apo et avec R6G. Ils restent assez similaires à ceux avec R6G, mais présentent une réduction plus marquée de leur amplitude. Ce résultat confirme

ainsi les hypothèses de réduction de l'espace conformationnel observées sur la R6G, et appuient l'hypothèse finale de l'article.

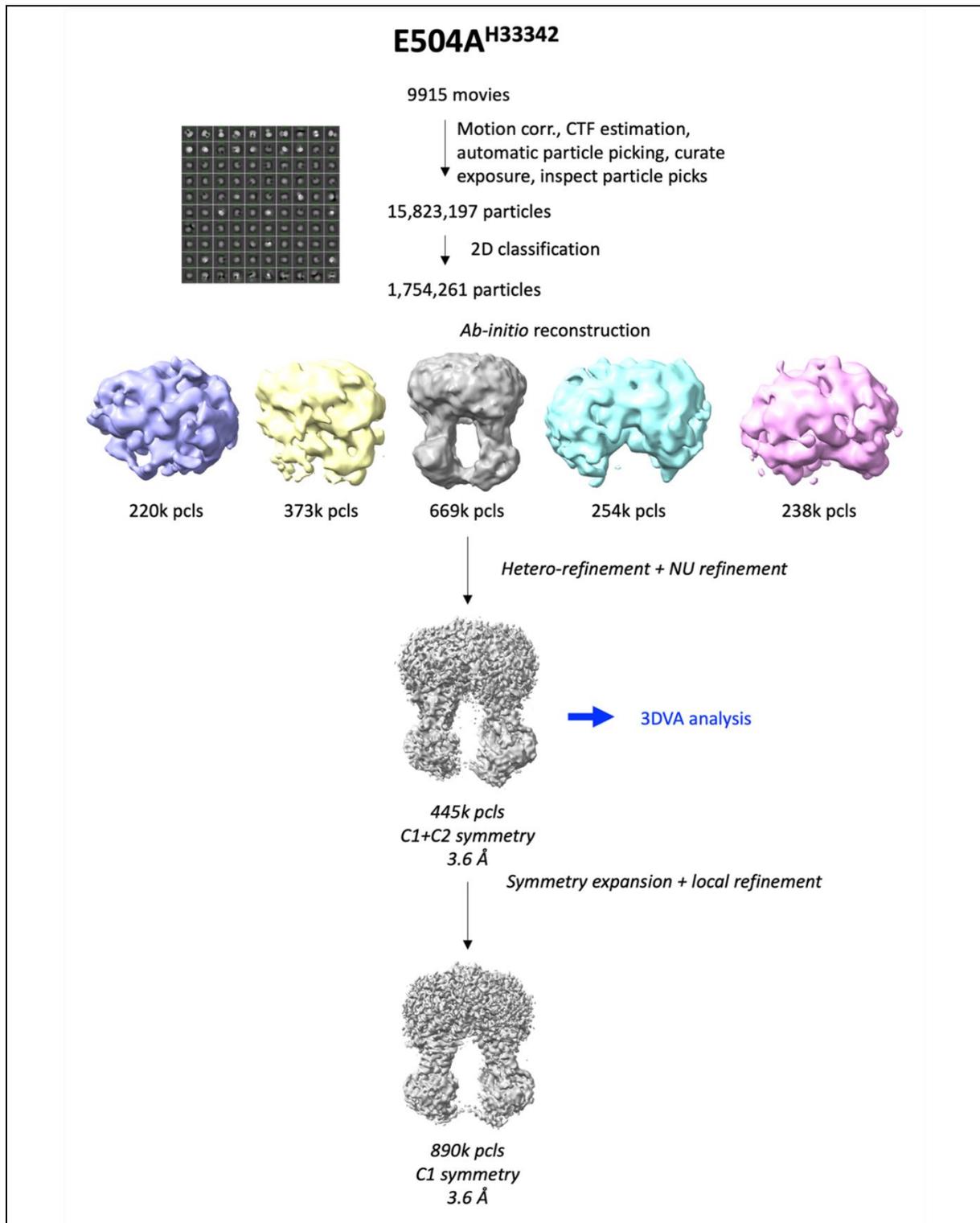


Figure 22 : Schéma de traitement des données du jeu BmrA-E504A en complexe avec le hœchst 33342

Le traitement des données a été effectué à l'aide de cryoSPARC. Le nombre de particules (pcls) sont indiqués pour chaque étape du processus et les résolutions finales ont été déterminées à partir de la FCS à 0,143.

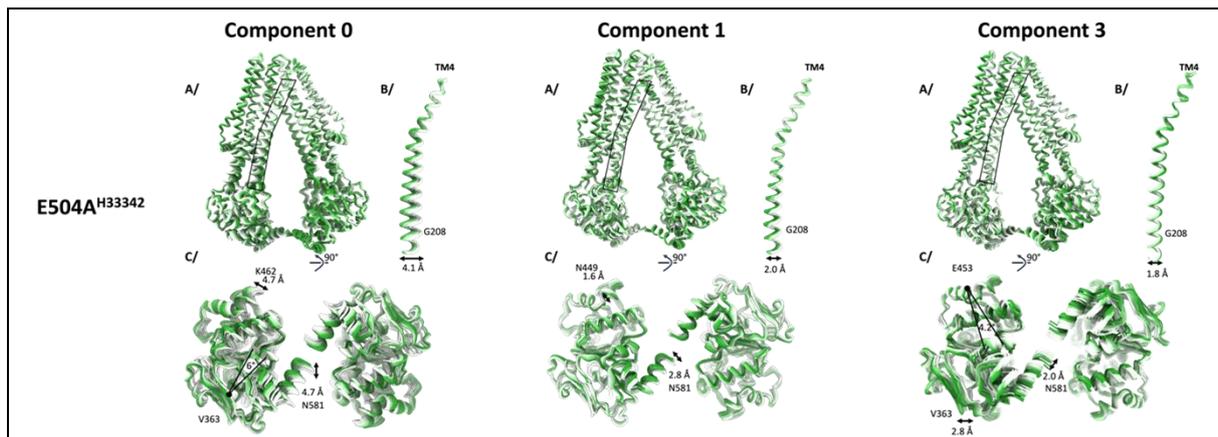


Figure 23 : Variabilité 3D de BmrA-E504A en complexe avec le hœchst 33342
 E504A^{H33342} est la condition avec le hœchst 33342 sans ATP, avec un gradient de couleur vert clair à foncé qui représente les 20 modèles affinés dans les 20 cartes de densités générées par 3DVA. A/ Ensemble des modèles de BmrA, B/ Représentation de l'hélice TM4, et C/ Vue de dessous des modèles des NBDs. Chaque mouvement est décomposé en 3 composantes principales et les flèches indiquent le sens des mouvements.

La R6G joue donc un rôle d'effecteur allostérique qui induit une coopérativité dans la fixation de l'ATP par la stabilisation des NBDs réduisant légèrement leurs mouvements. Ceci peut expliquer une transition de la conformation IF vers OF plus efficace chez le mutant dans une gamme de concentration d'ATP faible entre 20 et 300 μM . J'ai alors voulu comprendre quel serait l'impact fonctionnel du ligand sur l'activité ATPasique et le transport de BmrA.

J'ai testé l'activité ATPasique de BmrA sauvage en absence et en présence de R6G (cf. matériel et méthode). J'ai réalisé ce test sur BmrA en détergent, reconstitué en liposome et en membranes inversés. À très forte concentration d'ATP, il n'y a aucune stimulation de l'activité ATPasique mais à des concentrations d'ATP proche de la transition IF vers OF, j'observe une nette stimulation, qui reste modeste de l'ordre de 20 à 30 %. De même, cette stimulation a déjà été observée chez BmrA avec la réserpine en protéoliposome (Steinfels et al. 2004).

J'ai aussi examiné l'effet de cette gamme d'ATP sur l'efficacité de transport des drogues. Les tests de transports en membrane inversé avec la R6G ne sont pas si simples à réaliser. C'est pourquoi, j'ai utilisé le Hœchst 33342 et la doxorubicine pour déterminer la quantité de substrat transporté par ATP hydrolysé. Sur la même journée, j'ai réalisé les tests d'activité ATPasique et de transport sur le même lot de membrane en duplicat, avec la même gamme d'ATP. De même, j'ai réalisé ces tests sur le mutant inactif E504A pour contrôler s'il n'y avait pas d'activité parasite au sein des membranes. Ensuite, j'ai pris les pentes des vitesses initiales pour le transport et l'activité ATPasique. La quantification d'allocrite transporté a été réalisé à l'aide d'une gamme de fluorescence, réalisé le même jour que les autres tests. Le rapport relatif entre les vitesses de transport et d'activité ATPasique a permis d'établir le graphique de la figure 24. On peut remarquer que les courbes ont une allure biphasique ce qui implique l'existence de deux phénomènes en fonction de la concentration d'ATP. À de faibles concentrations d'ATP, il y a un couplage entre le transport de ligand et l'activité ATPasique. Ce rapport est proche de 1 pour le Hœchst 33342 à 300 μM d'ATP alors que celui de la doxorubicine est proche de 0,2. Ainsi, l'allocrite est transportée de façon plus efficace, mais cet effet disparaît à des concentrations d'ATP élevées ($> 1000 \mu\text{M}$) (cf. Supp-Figure 23-24 de l'article ci-dessous).

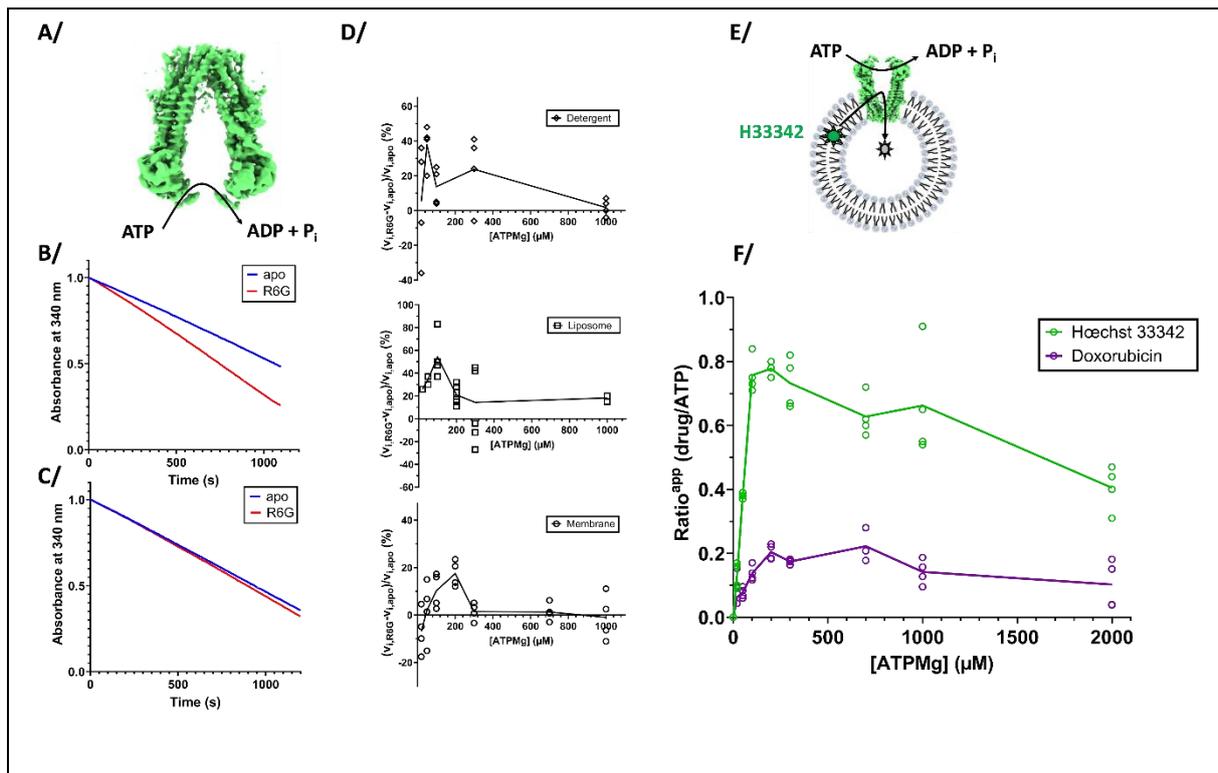


Figure 24 : Mesures de l'activité ATPase et du transport

A-C/ Mesure de l'activité ATPasique de BmrA avec 300 μ M (B) ou 1 mM (C) d'ATP-Mg²⁺ sans R6G (bleu) ou en présence de 100 μ M de R6G (rouge).

D/ Stimulation de l'activité ATPasique de BmrA par la R6G dans différents environnements amphipathiques (détergent, liposome, et membrane inversée). L'activation a été calculé en faisant le rapport de la différence entre les vitesses initiales entre la condition avec R6G et sans R6G par rapport à la vitesse initiale de la condition sans R6G. J'ai réalisé un quadruplicat sur le même lot de protéine.

E-F/ Efficacité du transport du Hœchst 33342 et de la doxorubicine en fonction de la concentration d'ATP. Ce rapport relatif est calculé à partir des vitesses initiales de transport et d'activité ATPasique par BmrA en membrane inversée. Le transport a été mesuré en suivant la fluorescence du Hœchst 33342 (en excitant à 355 nm et en mesurant l'émission à 468 nm) ou de la doxorubicine (en excitant à 468 nm et en mesurant l'émission à 593 nm) en membrane inversé.

3.3 Conclusions

L'article met en évidence l'adaptabilité de BmrA vis-à-vis de ses ligands, qui se manifeste par des changements conformationnels locaux. L'utilisation du mutant E504A a permis de caractériser la transition IF vers OF par une approche d'enzymologie structurale. L'obtention de proportions relatives entre les conformations IF et OF, en absence ou en présence de R6G et d'ATP, était corrélée aux données biochimiques (tests de fixation) ; elle permettait aussi d'expliquer le comportement michaélien ou allostérique de BmrA selon ces conditions. De plus, l'analyse structurale a aussi montré que la fixation de ligand influence sur la nature des mouvements de rotations et de translations au niveau des NBDs.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un modèle plus complet sur la plasticité du transporteur (Figure 25).

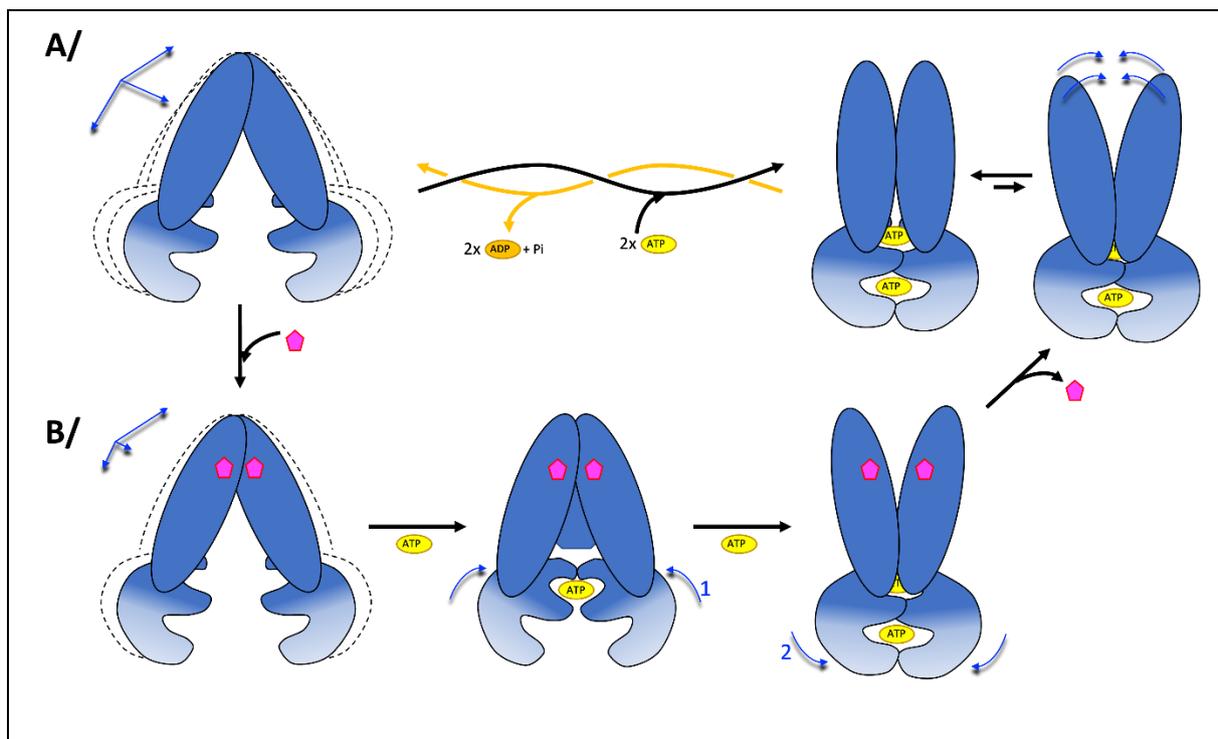


Figure 25 : Modèle de la plasticité de BmrA en absence ou en présence de ligand
Les flèches bleues indiquent le sens des mouvements de rotations et de translations au sein de BmrA.
Le pentagone rose représente le ligand pris en charge par BmrA comme la R6G.

BmrA est très flexible ce qui se traduit par une capacité d'exploration de l'espace conformationnel plus large des NBDs via des mouvements de rotations et de translations. La fixation de deux molécules d'ATP se fait de façon équivalente et simultanée ce qui va favoriser la dimérisation des NBDs. Ce rapprochement est accompagné par des changements de conformations qui favorisent l'ouverture des TMDs du côté extérieur. Dans cette conformation OF, la partie supérieure des hélices transmembranaires est très flexible car l'intérieur des TMDs est hydrophobe et ne peut pas être exposée au solvant. Ensuite, le retour à la conformation IF nécessite l'énergie d'hydrolyse des molécules d'ATP ainsi que le relargage des produits. Ainsi, le mécanisme de BmrA va osciller entre ces deux conformations selon un mécanisme d'oscillation entre ces conformations et de collapse hydrophobe, comme décrit précédemment.

Par contre, la fixation d'un ligand va réduire les mouvements de rotation et de translation dans la conformation IF au niveau des NBDs. La conséquence est que les NBDs ne sont plus en face-à-face direct pour pouvoir fixer les molécules d'ATP. Ainsi, la fixation du premier ATP est réalisée par un déplacement latéral et pivotement des 2 NBDs qui rapprochent les parties formant le premier NBS, créant ainsi une asymétrie transitoire des NBS. Ceci va favoriser la formation du deuxième NBS. Cette accélération de la dimérisation des NBDs facilite ainsi la transition de la conformation IF vers OF. Enfin, ce mécanisme semble être un modèle dérivé de celui de Monod-Wyman-Changeux sur l'allostérie (Monod, Wyman, et Changeux 1965; Changeux 2012). En effet, il respecte les postulats de base qui codifient le concept d'allostérie, comme : (1) les protéines allostériques sont des oligomères avec un arrangement symétrique entre les monomères, et (2) l'allostérie est produite par la fixation d'un ligand qui induit des changements conformationnels dans la structure quaternaire de la protéine en préservant la symétrie. Cependant, la particularité de BmrA est la perte partielle de la symétrie au niveau des NBS pour pouvoir être coopératifs.

Cette allostérie impacte le couplage entre le transport de l'allocrite et de l'activité ATPase de BmrA qui dépend des concentrations d'ATP. À de faibles concentrations d'ATP, un couplage existe. Toutefois, ce couplage est probablement dépendant de la nature du ligand. En effet, le rapport apparent entre l'activité de transport et d'ATPase dans le cas du Hoechst 33342 est proche de 1, contrairement à celui de la doxorubicine qui reste 5 fois plus faible. Ceci pourrait être expliqué par la différence des logP du Hoechst 33342 de 3 et de la doxorubicine de 0,8. Autrement dit, la partition du Hoechst est meilleur au niveau de la bicouche lipidique, ce qui semble indiquer une meilleure concentration locale autour de BmrA et suppose une diffusion plus rapide dans la poche de transport. En revanche, à de fortes concentrations d'ATP, le couplage n'est plus nécessairement strict. Ainsi, d'après ce modèle, le transporteur pourrait apporter un avantage sélectif pour la cellule bactérienne si son activité métabolique semble être plus faible. La protection vis-à-vis de toxique et la consommation d'ATP sont alors capitale pour la bactérie. Ces situations se retrouvent dans des cas comme pendant la phase stationnaire, la sporulation, des conditions de famines, ou le cas des persisters (Manuse et al. 2021; Nakatani et al. 2022; Shea et al. 2024).

Évidemment, il manque quelques informations sur ce modèle. En effet, il suppose que le transporteur puisse adopter une conformation occluse au cours du mécanisme, or il n'a pas été possible de l'identifier. Plusieurs hypothèses peuvent l'expliquer soit parce qu'il n'y avait pas assez de particules dans cet état, ou cette conformation est transitoire et ne peut pas être capturée dans des conditions d'états stationnaires. Toutefois, une telle structure a déjà été résolue chez d'autres exportateurs de type IV comme McjD, YbtPQ, et MsbA (Choudhury et al. 2014; Hu, Parkinson, et Zheng 2024; Mi et al. 2017). Afin d'acquérir des intermédiaires dans le cas de la cryoEM, il y a aussi la possibilité d'employer des conditions en turnover ou en temps résolu, autrement dit, laisser le système fonctionner en le stoppant à un moment donné par congélation. Cependant, cela demande une très bonne caractérisation biochimique du système, et parfois l'emploi d'un appareillage spécifique. Je me suis intéressé à ces aspects que je développe dans la deuxième partie.

3.4 **Publication 2** : R6G narrows BmrA conformational spectrum for a more efficient use of ATP

Authors:

Gobet A^{1†}, Moissonnier L^{2†}, Zarkadas E³, Magnard S², Bettler E⁴, Martin J⁵, Terreux R⁴, Schoehn G⁶, Orelle C², Jault JM², Falson P^{2*}, Chaptal V^{2*}.

Affiliations:

¹Department of Molecular microbiology and genetics. Universitetsbyen 81, 1874, 517. 8000 Aarhus C. Denmark

²Molecular Microbiology & Structural Biochemistry Unit. UMR5086 CNRS University Lyon-1. 7 passage du Vercors, 69007 Lyon. France

³Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, EMBL, ISBG, F-38000, Grenoble, France.

⁴ECMO team, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie (LBTI), UMR5305 CNRS University Lyon-1, 7 passage du Vercors, 69007 Lyon. France

⁵Laboratory of Biology and Modeling of the Cell, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5239, Inserm U1293, University Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

⁶Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, F-38000 Grenoble, France

* Correspondance to Vincent Chaptal (vincent.chaptal@ibcp.fr) and Pierre Falson (pierre.falson@univ-lyon1.fr; pfalson@me.com).

† These authors contributed equally to this work

Keywords:

ABC transporter, conformational spectrum, drug transport, allostery, plasticity.

Abstract:

Multidrug ABC transporters harness the energy of ATP binding and hydrolysis to change conformation and thereby translocate substrates out of the cell to detoxify them. While this general access mechanism scheme is well accepted, molecular details of this interplay is still elusive. Rhodamine6G binding on a catalytic mutant of the homodimeric multidrug ABC transporter BmrA triggers a cooperative binding of ATP on the two identical nucleotide-binding-sites, otherwise Michaelian. We investigated this asymmetric behavior via a structural-enzymology approach, solving cryoEM structure of BmrA at defined ATP ratio along the enzymatic transition, highlighting the plasticity of BmrA as it undergoes the transition from inward to outward facing conformations. Analysis of continuous heterogeneity within cryoEM data and structural dynamics, revealed that Rhodamine6G narrows the conformational spectrum explored by the nucleotide-binding-domains, describing the allosteric effect of drug binding that optimizes the ATP-dependent conversion of the transporter to the outward-facing state. Following on these findings, the effect of drug-binding showed an ATPase stimulation and a maximal transport activity of the wild-type protein at the concentration-range where the allosteric transition occurs. Drug diffusion rate is the likely rate-limiting step of the reaction, while drug transport and ATPase activities are in effect uncoupled.

1. Introduction

Drug resistance mediated by ABC (ATP-Binding Cassette) transporters contributes to the first line of defense for organisms, decreasing the intracellular drug concentration and allowing cells to further adapt by acquiring target mutations [1-3]. A typical hallmark of multidrug ABC transporters is the ability to recognize and transport a wide array of structurally unrelated substrates across the plasma membrane, thereby protecting the organism against many xenobiotics. These transporters thus harbor a polyspecificity for multiple ligands, that they can accommodate within a rather large and size adaptable binding pocket. The wealth of structural data available on these transporters as well as the biochemical and biophysical characterizations have highlighted their plasticity and their ability to adapt to various ligands [4-9]. At the core, it is clear that ABC transporters are very flexible and undergo significant conformational changes to perform their transport function.

Type IV ABC transporters involved in MultiDrug Resistance (MDR) phenotype perform their function by undergoing a series of conformational changes pertaining to the alternating access mechanism. They are formed of two trans-membrane domains (TMD) forming a cavity at their center where substrates bind, and of two nucleotide-binding domains (NBD) binding and hydrolyzing ATP-Mg²⁺ to fuel the system. At resting state, they populate an Inward-Facing (IF) conformation where substrates can bind. Binding of ATP-Mg²⁺ to the NBDs bring them together, translating this conformational change to the TMDs which then open towards the outside (Outward-Facing, OF) where substrates are released. ATP hydrolysis and product release reset the transporter back to the IF conformation, ready for another cycle. While the overall scheme of this transport cycle is widely accepted, details of each step and their order are still highly debated.

The *Bacillus subtilis* efflux pump BmrA, belongs to the type-IV family of MDR ABC transporters[10, 11], conferring resistance to cervimycin-C secreted by the biotope competitor *Streptomyces tendæ*[12]. A *B. subtilis* strain resistant to the antibiotic was isolated and contained mutations on the *bmra* promotor region increasing and stabilizing its mRNA, which results in BmrA overexpression at the membrane[12, 13]. BmrA binds and transports many structurally-unrelated drugs, including doxorubicin or daunorubicin, Hoechst33342, Rhodamine6G (R6G) or ethidium bromide[11, 13]. BmrA harbors a demonstrated plasticity to handle its ligands, thus conferring an evolutionary advantage to

cells. It has been postulated that instead of going through discrete well-defined states, it uses its intrinsic plasticity to swing back and forth around an intermediate occluded state while deforming to adapt to each transported molecule[10, 13-17]. However so far, the molecular details of such critical plasticity and how it couples both functions of drug translocation and ATP hydrolysis lacks detailed structural information.

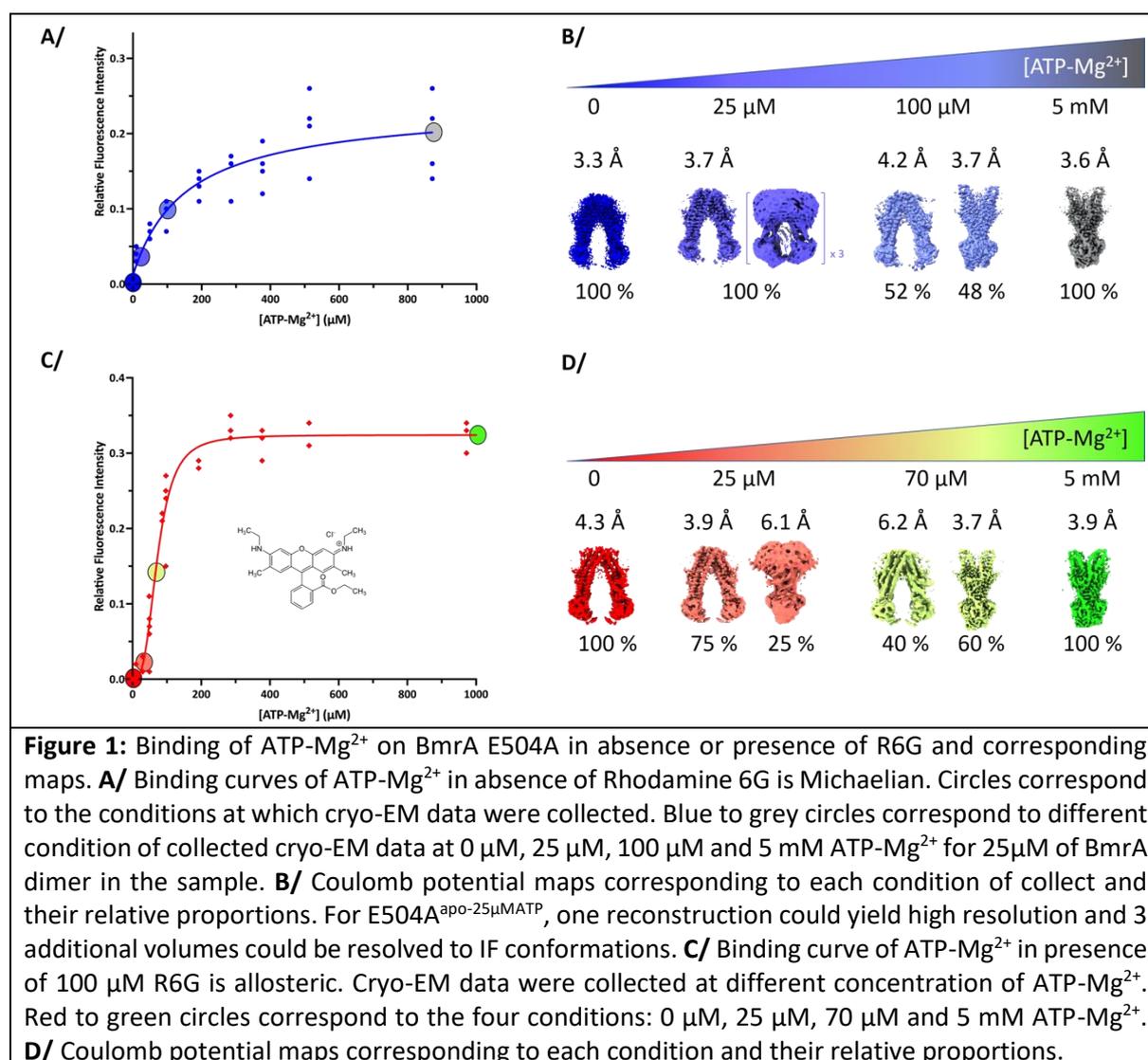
Here, we get insights on BmrA plasticity undergoing the IF to OF conformational change and its ability to respond to ligand/substrate binding using a structural enzymology approach. We first probed ATP-Mg²⁺ binding to BmrA in the absence or presence of R6G, showing a shift from Michaelian to allosteric behavior. We then visualized by cryoEM the effects of both ligand binding along this transition. We further analyzed protein flexibility within cryoEM data using a software we developed [18], and reproduced these findings by Molecular Dynamics (MD) simulations. Data show that R6G focuses BmrA conformational changes, allowing for a more efficient space exploration. Finally, we could establish that drug binding and shift in flexibility results in ATPase activation for ATP concentration where the transition occurs, resulting in a tighter coupling of transport and ATPase activities, otherwise uncoupled.

2. Results

2.1 Shift from Michaelian to allosteric ATP-Mg²⁺ binding in response to R6G binding

BmrA is a dimer, each monomer bearing 1 TMD and 1 NBD [19]. The two NBDs are thus identical, and the OF structure of the E504A mutant we previously solved confirms that they bind ATP-Mg²⁺ identically[13], in accordance with all other structures of type-IV ABC transporters. Probing ATP-Mg²⁺ binding (Figure 1A) indeed reveals a Michaelian type of binding (hyperbolic-type curve, $K_{d-app} = 154.0 \mu\text{M} \pm 49.0$). Importantly, the E504A catalytic mutant that still binds ATP but cannot hydrolyze it [20] was used in this study; this thus allowed to probe a unidirectional conformational transition from IF to OF states, BmrA being blocked when reaching the OF conformation when complexed with ATP-Mg²⁺. Interestingly, addition of the substrate R6G prior to ATP-Mg²⁺ binding resulted in a sigmoidal-type curve, suggesting an allosteric binding of ATP-Mg²⁺ (Figure 1C), and meaning that although identical the NBDs do not bind ATP-Mg²⁺ the same way anymore ($K_{0.5} = 70.0 \mu\text{M} \pm 2.6$, $n=3.4 \pm 0.3$). In addition, the pre-binding of R6G increased the apparent affinity for ATP, together with the steep transition suggesting that R6G binding ensures a more efficient conversion to the OF conformation mediated by ATP-Mg²⁺ binding. Since this behavior has consequences on the transport cycle, we performed a structural enzymology study to investigate this transition structurally. CryoEM grids were frozen at key ligand concentrations and imaged; without ATP-Mg²⁺ in absence or presence of R6G (named E504A^{apo} and E504A^{R6G}), at a 1:1 molar ratio ATP-Mg²⁺:BmrA dimer (E504A^{apo-25 μ MATP} and E504A^{R6G-25 μ MATP}), at the $K_{0.5}$ or close to the K_{d-app} for ATP-Mg²⁺ (E504A^{apo-100 μ MATP} and E504A^{R6G-70 μ MATP}), and at saturating concentrations of ATP-Mg²⁺ (E504A^{apo-5mMATP} and E504A^{R6G-5mMATP}) (Figure 1, SuppFigures 1-8). Without nucleotide, BmrA is 100% in the IF conformation, in good agreement with SANS and HDX results [16], as well as cryoEM structures of the WT protein and A582C mutant [21] and single molecule FRET recent studies [22]. Progressive addition of ATP-Mg²⁺ shifts the population towards the OF conformation to reach 100% of the population at saturating ATP concentrations. At a 1:1 molar ratio ATP-Mg²⁺:BmrA in the presence of R6G, 25% of BmrA population already shifts towards the OF conformation. This is in good agreement with the allostery model, and the notion that ATP-Mg²⁺ binding to one monomer increases the affinity of ATP-Mg²⁺ for the other monomer (Figure 1D). Two molecules of ATP-Mg²⁺ are thus trapped in the OF conformation, being 50% of the ATP-Mg²⁺ in the sample, and the clear shape of the OF conformation makes it distinguishable in the reconstructions. In contrast, in the absence of R6G (E504A^{apo-25 μ MATP}), only IF reconstructions could be observed as ATP-

Mg²⁺ will distribute equally among both NBDs and will not yield enough particles in the OF conformation to be seen (Figure 1B). These results are consistent with the transition curve observed. At the K_{0.5} for ATP-Mg²⁺, 60% of the population is switched to the OF conformation in presence of R6G (E504A^{R6G-70μMATP}), while greater concentrations of ATP-Mg²⁺ are required to reach a similar population distribution in the absence of drug. Altogether, this structural enzymology approach exemplifies how R6G binding on BmrA results on a more efficient conversion from IF to OF conformation, on a narrower range of ATP-Mg²⁺ concentration.



2.2 Flexibility of BmrA in the IF and OF conformations

3D models were built into each high-resolution 3D reconstruction to gain molecular insights on the IF to OF conversion (Figure 2, Supp-Figures 9). Clear electron densities could be observed for R6G in all the IF and OF reconstructions where it was added. In contrast, all reconstructions where R6G was absent did not show density in the substrate-binding cavity (Supp-Figure 10). For the OF conformation, current observations represent a biological duplicate of observations we previously made in [13], with R6G wedged between TM1-2 and TM5'-6' of each half transporter, with a total of 2 R6G per BmrA dimer (Figure 2DE). Binding of R6G triggers a closure of TM1 towards TM2, reinforcing the hand-fan

motion of these 2 TMs previously hypothesized [13]. Admittedly, density for R6G is not very well defined, allowing for multiple positioning of the molecule, which denotes intrinsic R6G flexibility within the drug-binding pocket, as was also observed by molecular dynamics (MD) simulations [13]. In the IF conformations, R6G could also be modelled within the TMD in-between the same TM helices. Here again, electron density denotes multiple positions adopted by the molecule (also observed in MD simulations below), in line with the ability of BmrA to recognize structurally-unrelated ligands. To exemplify this, we have modelled R6G in 2 conformations of the benzoate moiety with 180° flip of the xanthene core fitting equally well (Figure 2C, left). In E504A^{apo}, E504A^{apo-25μMATP} and E504A^{apo-100μMATP}, multiple IF conformations of BmrA are observed with a rearrangement of TM helices and the NBD (Figure 2A-C), in line with the flexibility observed for BmrA [16, 21] and other ABC transporters in this conformation [4, 7, 23]. Notably, the E504A^{apo} structure is exactly the same as the WT or A582C mutant structures recently solved (rmsd = 0.52Å over 902 atoms and 0.45 Å over 883 atoms, respectively; suppFigure 11 [21]). R6G binding in E504A^{R6G} and E504A^{R6G-25μMATP} results in a further rearrangement of TM helices within the dimer, with a wider opening of TM4-5-6'. Surprisingly, the rearrangement does not occur within a monomer, as it overlays well with BmrA in absence of R6G (Figure 2C, right part of the structure on which the overlay is performed). The effect of R6G binding further translates all the way to the NBD, resulting in a reorientation of the 2 NBD that face each other more directly (Figure 2B), hinting at an influence on ATP binding observed in Figure 1. Altogether, these structures highlight the flexibility of BmrA in the IF conformation, and the fact that R6G has an allosteric effect that reorients the protein at the ATP-binding site level, reminiscent of what was observed for ABCB1 in presence of drug or inhibitor [24].

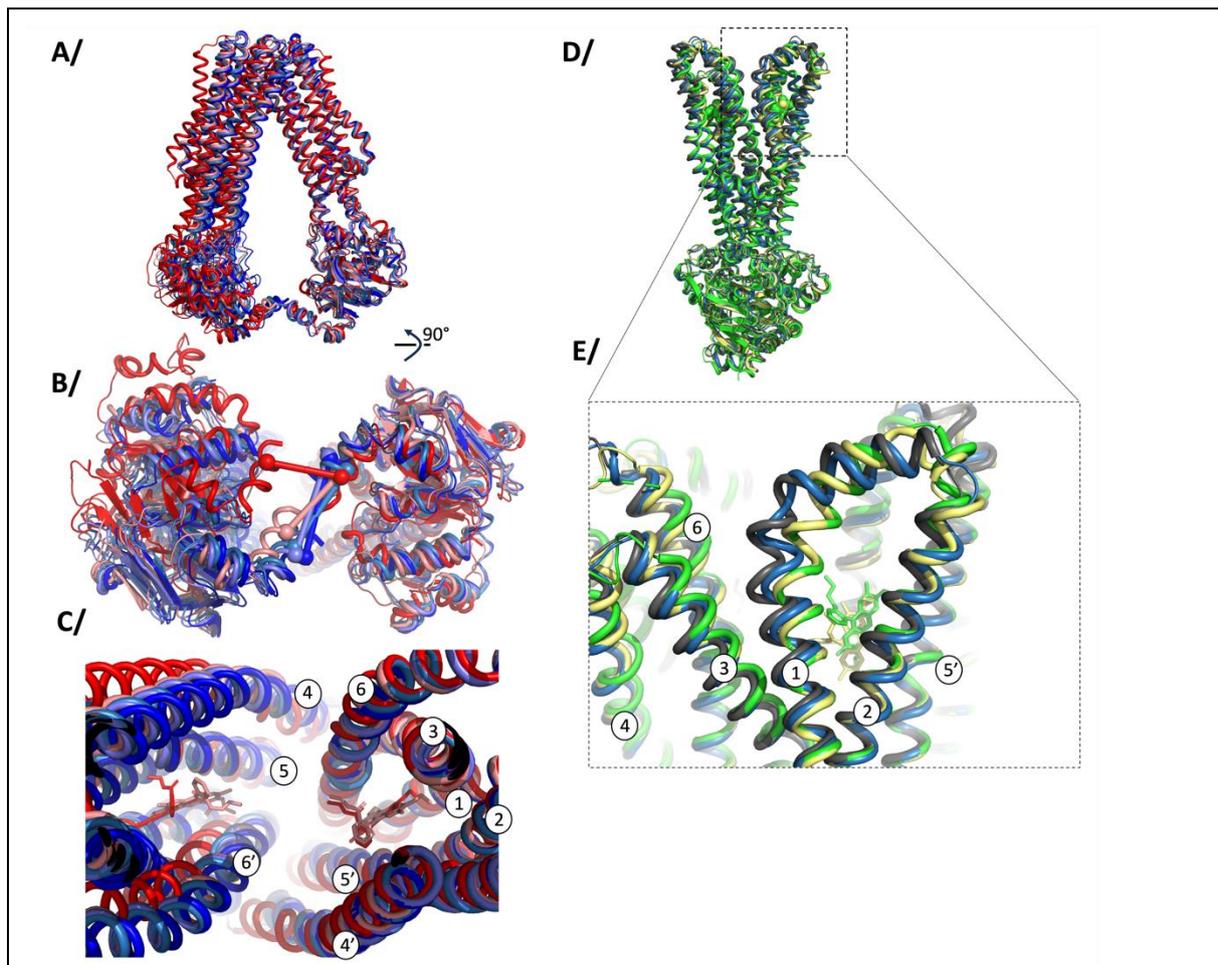


Figure 2: Superposition of models in IF or OF conformations. Colors match the ones of Figure 1 and Supp-Fig 9. Protein in cartoon and ligands are in sticks, TM helices are numbered when appropriate. **A/**, **B/** and **C/** BmrA in the IF conformation seen from the side, from under the NBD or a close up of the substrate-binding pocket, respectively. Overlay was performed on the 3 first TM helices of chain A, residues 1-161. On panel **B/**, a line is drawn between residues 577 of each monomer to highlight the conformational change. **D/** and **E/** show BmrA in the OF conformation, with **E/** being a close-up view of the TM1-2 loop with R6G in its pocket. Overlay was performed on the last 4 helices of chain A, residues 104-300 as in [13].

2.3 Impact of R6G on BmrA dynamics and conformational space exploration

With cryoEM structure solution, it is possible to visualize inter-particle difference within a reconstruction, allowing to deconvolute protein movements in several directions of latent space [25]. Note that these changes can be observed through different methods available in many software, nicely reviewed in [26]. Importantly, the movements that can be observed result from different interpretation of the latent space and on how to deconvolute the movement. Software using neural networks to deconvolute movements, such as manifoldEM, 3DFlex, CryoDRGN [27-29] or others use non-linear interpretation of the data to show deformations linking sub-states within the particle stack. These methods are very powerful to highlight special deformations undergone by the protein within each sub-state but will not model the link between sub-states. In a different manner, linear models of conformational heterogeneity, such as multibody refinement or 3DVA [25, 30], perform a principal component analysis of particle variance compared to the consensus reconstruction. This later analysis allows to decode general types of movements present within the particle stack, decomposing complex movements into simplified motions; the global movements undergone by the protein are thus

visualized through several main components, allowing for a deconvolution of a complex movement into simplified sub-movements. This later analysis was chosen to analyze the current datasets as it can reveal the overall influence of R6G on BmrA deformations and conformational space exploration. 3DVA was computed in simple mode, resulting in adding weights to the consensus map in latent space directions calculated by principal component analysis, or intermediate mode calculating real maps along the same direction. For this case, both methods gave the same result.

Such calculation was applied to E504A^{apo} and E504A^{R6G} to visualize movements within BmrA as a response to R6G binding (Supp-movies). Of note, the particle stacks of these two datasets show similar distribution of particles in 3D (no special orientation of the protein within the ice), and a gaussian distribution in latent space, allowing to compare similar types of particle distribution, making the movements directly comparable (Supp-Figure 12). To fully understand underlying movements, we designed a software that refines an ensemble of models inside this ensemble of maps [31] and applied the procedure to BmrA (Supp-figure 13). Each component shows different movements, with clear rotations and translations of the NBD, that originate from the kinks in TM helices (Figure 3AB, Supp-Figures 14-16). For E504A^{apo}, three types of movements could be inferred. First a 12° rotation of the NBD in the continuation the TM helices, centered on the NBD beta sheet (V363), is observed in the first component (component 0). Second, a 16° rotation of the NBD alone centered on E453 is observed, without movement of TM helices (Component 1). Third, an overall oscillation of the structure is observed with translations leading the NBDs 5 Å away from each other (component 2). In presence of R6G (E504A^{R6G}) similar protein motions are observed and can thus be directly compared to E504A^{apo}; the principal components in which these movements appear are different as expected for this type of analysis. The first NBD rotation centered on V363 is conserved in E504A^{R6G}, while the rotation centered on E453 is reduced by more than half. Notably, the oscillations that bring the NBDs closer together is greatly affected as the E504A^{R6G} structure is stiffened and movements are very reduced (less than 1 Å) (Figure 3AB). This analysis shows that 1/ the NBDs explore a large conformational space by undergoing rotations and translations. The presence of R6G influences one rotation by reducing half of its amplitude; importantly the NBD movements start from a different starting point in presence of R6G with the NBDs already oriented closer to one another. 2/ The presence of R6G stabilizes the NBDs slightly further apart with reduced translation in this direction. Overall, R6G decreases the space exploration of the NBDs. At first, this interpretation might seem counter-intuitive as we would expect NBDs to close more easily according to the allostery model, but one has to keep in mind the different time-scale of the experiment. Further investigations below bring more sense to this observation.

We then subjected both proteins to MD simulations in a lipid bilayer to investigate movements in the IF conformation linked to R6G binding (Figure 3C-F, Supp-Figures 17-22). ATP-Mg²⁺ was added in an attempt to induce full closure. All replicates show BmrA movements towards a closure of the drug-binding cavity and the NBDs getting closer to each other. The amplitudes of the movements are in different range in each replicate, but overall, all the distances aggregated show that both E504A^{apo} and E504A^{R6G} are able to move with similar range (Supp-Figure 20); the drug thus does not prevent BmrA overall movements. However, the conformational space explored by E504A^{R6G} is much more focused compared to E504A^{apo} in which NBDs are moving in many directions (Supp-Figures 19), showing the allosteric influence of R6G on the NBDs. Simulations also reveal that R6G is mobile within its binding pocket but only explores the nearby space of its original position, owing to the hydrophobicity of the substrate-binding pocket (Supp-Figure 22). When R6G is present, TM helices mostly stay near their original positions, suggesting that R6G prevents direct closure of helices due to steric hindrance, while a stronger closure is observed in its absence. Altogether, the dynamic studies of R6G effect on NBD closure indicate that it reduces and focuses the conformational space explored by BmrA in the IF conformation.

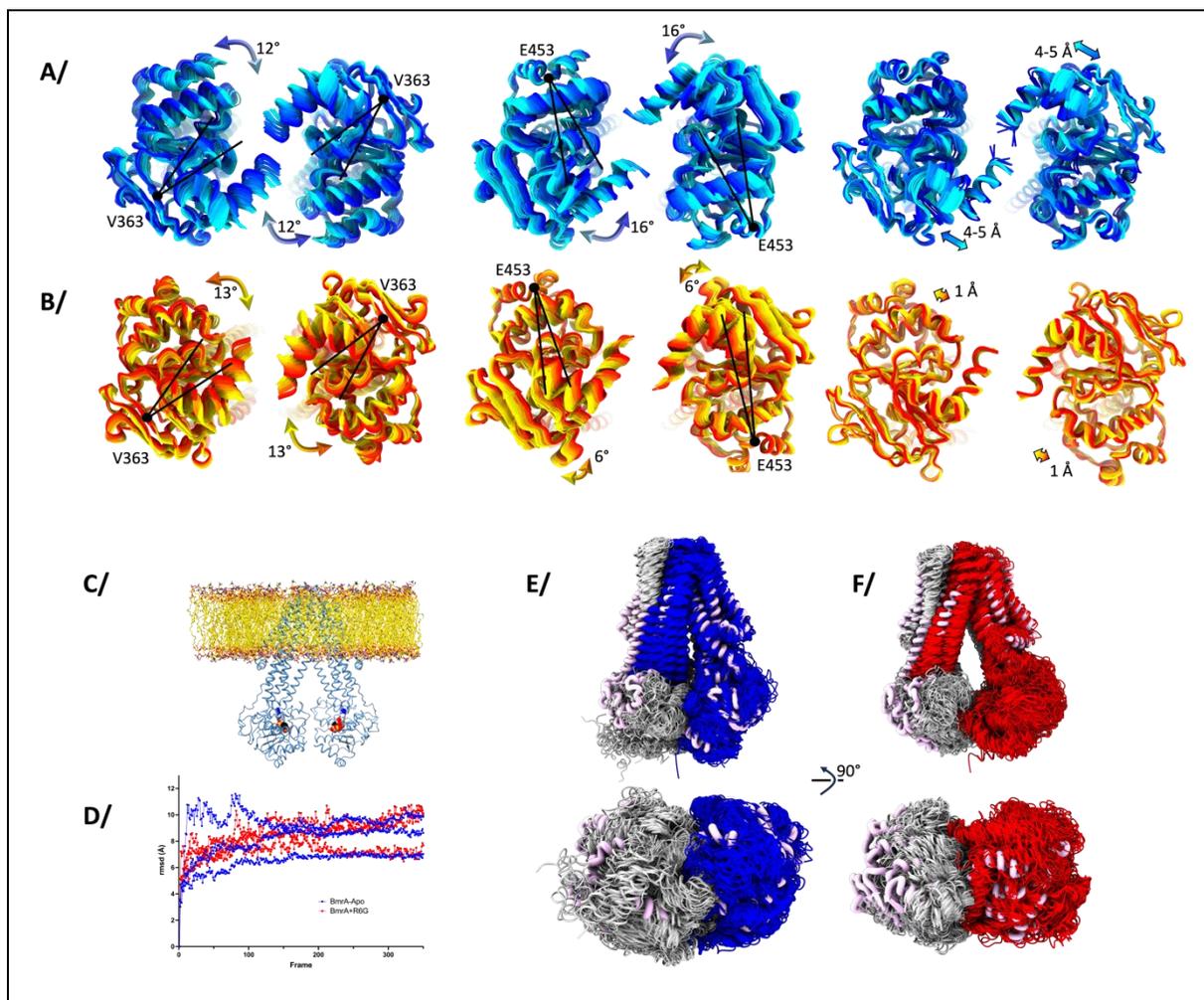


Figure 3: Dynamics of BmrA in the IF conformation. **A/** 3DVA analysis of E504A^{apo} in the first 3 components, resulting in 20 maps each. Models built by variability refinement in the maps are represented in cartoon and colored from blue to cyan, with view from the NBDs. The main movement is represented on the structure with black lines representing the NBD rotation and the colored arrows depict the movement and its amplitude. Details of this analysis are shown in Supp-Figure 17-22. **B/** same as A/ for E504A^{R6G}, colored from red to yellow. **C/** BmrA was inserted in a lipid bilayer and ATP-Mg²⁺ was added to start MD simulation, with or without R6G. **D/** Rmsd of the MD trajectories for 3 replicates. The color code corresponds to E/ and F/. **E/** Overlay of 3 replicates of MD simulations of BmrA apo to show the conformations sampled during the simulations. Thick pink ribbons correspond to the initial structure. **F/** same as E/ for BmrA in presence of R6G.

2.4 Impact of R6G on ATPase and transport activities

Since R6G induces a sharp transition from the IF to the OF conformation over a narrow range of ATP-Mg²⁺ concentration, the effect on ATPase activity was investigated in this range. Indeed, when investigated at high ATP-Mg²⁺ concentration with R6G, Doxorubicin or Hoechst33342, no stimulation was observed [11, 32, 33]. However, at low ATP-Mg²⁺ concentrations, a clear stimulation is observed (Figure 4ABC), corresponding to the concentration range where the IF to OF transition occurs. Similar stimulation is observed in detergent, liposome or in membrane vesicles (Figure 4D). In all cases, where the ATP-Mg²⁺ concentration is above the K_{d-app} for ATP, i.e. ATP binding is not limiting anymore, no stimulation is observed confirming previous studies. We then investigated the transport efficiency for

Höchst33342 and Doxorubicin at varying ATP-Mg²⁺ concentrations (Figure 4E-F, Supp-Figure 23-24) as unfortunately R6G transport cannot be followed in membrane vesicles [13] but they nevertheless induce allosteric binding of ATP-Mg²⁺ (Supp-Figure 25). We quantified on the same membrane fraction the Höchst33342 transport and ATPase activity of BmrA, to determine the amount of substrate being transported in relation to the ATP consumption. The experiments were carried out the same day for a precise quantification of both activities and conducted in quadruplicates from two separate batches of membrane preparation. Höchst33342 transport per ATP hydrolyzed increases up to a maximum of 0.8 for 200-300 μM ATP-Mg²⁺, and slowly decreases afterwards. This biphasic curve implies that two phenomena are occurring. At low ATP-Mg²⁺ concentrations, a near strict coupling of Höchst 33342 transport with ATP hydrolysis happens, while ATP gets hydrolyzed faster than its use for substrate transport at higher ATP-Mg²⁺ concentrations. For Doxorubicin, a similar curve is observed with a wider peak spreading over 300-1000 μM ATP-Mg²⁺, and reaching a maximum of 0.2 Doxorubicin transported per ATP hydrolyzed. This seems to also indicate that when ATP-Mg²⁺ concentrations are low resulting in slow binding to BmrA, the drug is transported more efficiently in regard to ATP consumption, while this effect disappears when the later concentrations rise.

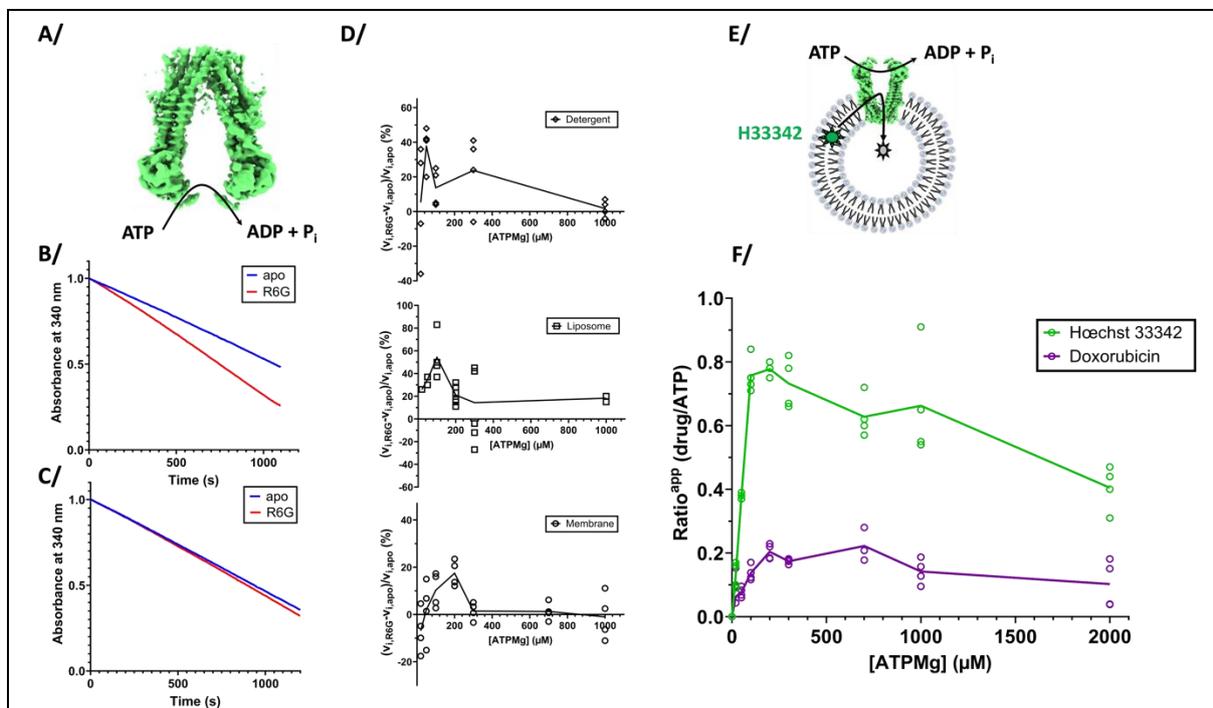


Figure 4: ATPase activities and transport measurements. **A/** Schematic ATPase activity of the transporter **B/** ATPase activity can be measured by following disappearance of ATP via a coupled enzymatic assay; decrease of absorbance at 340nm is directly correlated to ATP hydrolysis. Blue curve for BmrA apo, and red in complex with R6G. The slope is greater with R6G showing a faster ATP hydrolysis. This example is for the point 300 μM ATP for BmrA in detergent as shown in **D/**. **C/** same as **B/** for 1 mM ATP showing no stimulation. **D/** ATPase activity measured in detergent, liposomes or in membranes. Each point represents a kinetic experiment as in **B/** for a range of ATP concentration, acquired with or without R6G. The slope of each curve was measured at initial speeds, and the normalized ratio is presented on the graph to show the activation. **E/** Scheme of Höchst 33342 transport in membranes occurring with ATP hydrolysis. **F/** Transport efficiency of Höchst 33342 or Doxorubicin transported per ATP hydrolyzed along the range of ATP-Mg²⁺ sampled in **C/**. Individual measures are indicated on the graph (quadruplicates) and the line links the average of each concentration of ATP-Mg²⁺ sampled. Details of this experiment are shown in supp-Figures 23-24.

3. Discussion

Allostery between the substrate-binding site and the NBDs in ABC transporters has been very often described for many transporters and in various settings (a few examples here [7, 34-37]). It remains however difficult to study and to investigate at the molecular level being the result of multiple factors. Here we used the sharp effect produced by R6G on BmrA, to visualize the IF to OF transition, over a narrow range of ATP-Mg²⁺ concentration; the use of the ATPase inactive mutant E504A, which still binds ATP-Mg²⁺ but does not hydrolyze it, permits this structural enzymology approach as the mutant only undergoes the forward direction and is blocked in the OF conformation (Figure 1). The allostery manifests in several ways, visible at the NBD site. First, there is a structural rearrangement of the NBDs towards each other. This is possible with the intrinsic plasticity of BmrA in the IF conformation that allows to sample different conformations (Figure 2A-C), as also previously observed by NMR spectroscopy, HDX-MS or SANS studies [15-17]. Substrate binding to the drug-binding cavity thus optimizes the positioning of the NBDs. Second, the conformational space exploration of the NBDs is also influenced by R6G binding, as probed by the continuous heterogeneity analysis of cryoEM data (Figure 3). The substrate reduces the overall motions undergone by the NBDs, decreasing rotations and translations of the sites towards one another. This reduction in space exploration is also visualized by MD simulations where R6G also focuses the motions sampled by the NBDs (Supp-Figure 19). In both observations, the NBDs are still very mobile, the presence of the drug does not prevent movement but rather allosterically influences the directions of the space exploration. Since the ATP-binding sites (NBS) are shared between the two NBDs, ATP-binding implies that the NBDs come in close proximity. However, R6G prevents direct closure of the transporter using symmetrical closure as hypothesized for the apo WT transporter in absence of drug [21]; indeed, R6G binding in the drug-binding pockets prevents the TM helices to deform and to directly come close to the symmetric mates in the dimer. We hypothesize that this forces the TM helices to deform around the drug, which will have the consequence of forming a first NBS with ATP sandwiched between the Walker A motif of one NBD and the signature C motif of the opposite NBD (Figure 5). This site would correspond to the high affinity site and would help prime the other NBS for ATP binding, in accordance with the allosteric model. Of note, allostery at the NBS level during ATP hydrolysis has previously been observed by solid-state NMR for BmrA, illustrating that the two NBS can be asymmetrical of each other and reinforcing the plastic behavior of this transporter[11, 15].

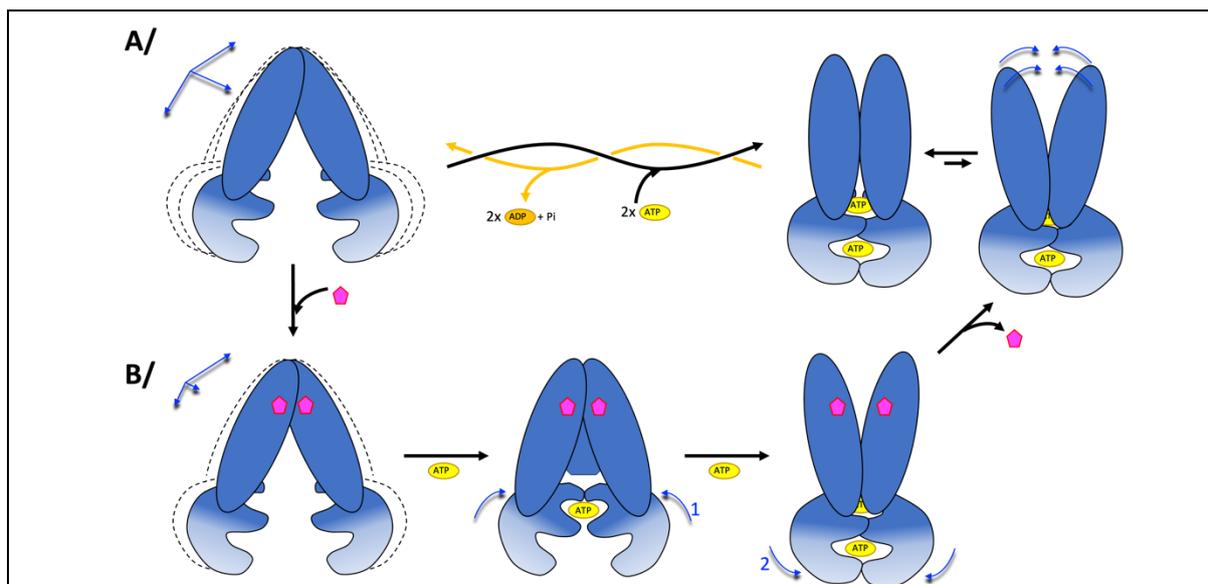


Figure 5: Model of transport mechanism. **A/** In absence of substrate, BmrA in the IF conformation is very plastic. The 2 NBS bind 2 ATP-Mg²⁺ (yellow cylinder) identically, leading to the OF conformation. Plastic deformation is transferred to the other side of BmrA for release of a potential substrate; return to the IF conformation is achieved via ATP hydrolysis and release of ADP-Mg²⁺ (orange cylinder). **B/** In presence of substrate, flexibility of the IF conformation is reduced and symmetrical closing is prevented by the presence of the drug. Binding of the first ATP-Mg²⁺ occurs by deformation around the drug, leading to the formation of the first NBS, which increases affinity for the other NBS and formation of the OF conformation. Using plasticity of the OF side of BmrA, substrate is released and the initial pathway of ATP hydrolysis is used to reset to the IF conformation.

Since the allosteric effect of R6G is to reduce the conformational space and to focus the movements explored by the NBDs, with a consequence of a sharp transition from IF to OF over a narrow range at ATP-Mg²⁺, we hypothesized that the drug would stimulate ATP hydrolysis in this narrow range of ATP-Mg²⁺ concentration. Indeed, such observation was made, in detergent, liposomes or membrane vesicles, with a peak of stimulation centered on 100-300 μM ATP-Mg²⁺, supporting the proposed model. However, the stimulation remains modest for BmrA compared to what can be observed for other Type-IV ABC transporters [38]. The maximum stimulation stays in the 30-40% activation, like what was also observed for reserpine, another substrate of BmrA[11]. This led us to investigate the stoichiometry of transport for BmrA of two substrates, H \ddot{o} chst33342 and doxorubicin. They both induce allosteric ATP-Mg²⁺ binding like R6G (Supp-Figure 25) and their transport assays can be followed by fluorescence using inverted membrane vesicles[11, 13, 39]. For both substrates, a peak of substrate transported per ATP hydrolyzed is observed for the same range of 100-300 μM ATP-Mg²⁺ where stimulation occurs, as well as the transition IF to OF is maximal following ATP-Mg²⁺ binding. The ATP range for which the substrate stimulates ATP hydrolysis thus also corresponds to a more efficient drug transport (Figure 4DF). One can also note that H \ddot{o} chst33342 and R6G binding pockets are shared in the homolog human ABCB1 [40], thus, since there are 2 R6G bound on BmrA it is most probable that 2 H \ddot{o} chst33342 or Doxorubicin also bind in BmrA substrate cavity (Supp-Figure 25). Since 2 ATP-Mg²⁺ are required to achieve the OF conformation and the ratio H \ddot{o} chst 33342:ATP-hydrolyzed reaches values close to 1:1, it is likely that at the peak, 2 H \ddot{o} chst33342 will be transported by cycle, resulting in an almost fully coupled activity. The smaller than 1 ratio also indicates that ATPase activity nevertheless occurs without any substrate bound to the drug-binding cavity or that the IF to OF transition occurs with only one H \ddot{o} chst33342 bound. Also, at higher ATP-Mg²⁺ concentrations, ATP-

Mg²⁺ binds faster and gets hydrolyzed faster than H_ochst is being transported, pointing rather to an uncoupling of the activities. Altogether, this would point to the diffusion of substrate inside the drug-binding pocket as a limiting factor for transport, as previously hypothesized by the kinetic selection model [41]. This hypothesis is reinforced with doxorubicin having a much lower ratio towards ATP. Since the LogP of these two drugs are different (3 for H_ochst33342, 0.8 for Doxorubicin as determined by ACD percepta), it implies a lower partition of Doxorubicin within the lipid bilayer or lower accessibility from the cytoplasm to reach the drug-binding site. Altogether, this clearly reveals a decoupling between the activities of drug transport and ATP hydrolysis for BmrA. We thus hypothesize that the diffusion rate of drugs into BmrA binding pockets is the limiting factor for transport, while ATP is being used constantly[38]; if a drug is bound while a cycle is being performed upon ATP-Mg²⁺ binding, it will be transported.

The allosteric effect of drugs on ATP-Mg²⁺ binding (Supp-Figure 25) is nevertheless meaningful at low ATP-Mg²⁺ concentrations as it results in a stimulation of drug transport efficiency (Figure 4C). Low ATP concentrations can be found in bacteria under early or stationary phase in rich or minimum media[42], starvation conditions[43], during sporulation or within persister cells[44]. In these conditions, ATP is scarce and precious, and cannot be wasted on a transporter working constantly; thus drug binding would have a positive influence on ATP-Mg²⁺ binding and will help the transporter to transport them more efficiently by more strictly coupling the two activities, thereby protecting the cells against xenobiotics. Under more favorable growing conditions, ATP concentrations rise and the need for an allosteric effect is diminished as the transporter functions faster[38].

Finally, the allostery described here is a derivative from the well-established Monod-Wyman-Changeux (MWC) model that apply to many systems [45]. Instead of stabilizing by ligand binding some clearly defined R and T states influenced by ligand-binding, we observe here that R6G indeed influences the conformation of the protein by reorienting the NBDs, reminiscent of the two states described in the MWC model, but more so modulates protein dynamics and conformational space exploration. This observation opens new avenues of investigations to understand structure/function relationship within proteins.

4. Materials & Methods

4.1 *BmrA* expression and purification

C43(DE3)ΔAcrB *E.coli* strain is transformed with the plasmid pET15b encoding for the BmrAE504A mutant fused to a 6-histidine tag in N-terminal. A transformed colony is incubated in 3 mL of LB media supplemented with 50 μg/mL of ampicillin for 7 h in 37 °C with shaking. 30 μL from this day culture are diluted in 1 L of LB media containing 50 μg/mL of ampicillin and incubated overnight at 22 °C with agitation. When OD⁶⁰⁰ reaches 0.6, BmrA overexpression is induced by adding 0.7 mM IPTG. Culture is then incubated for 5 h at 22 °C under shaking. Bacteria are collected by centrifugation at 5000 xg for 15 min, 4 °C. Pellet is then suspended in 20 mL of 50 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM MgCl₂. Bacteria are lysed by 3 passages with a disruptor Constant CellD system at 1.5 kbar, 4 °C. The bacterial suspension is centrifuged at 15,000 xg, 30 min, 4 °C. Supernatant is centrifuged for 1 h, 180,000 xg, 4°C to pellet membranes. The membrane fraction is suspended in 25 mL of 50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, anti-protease CLAPA 1X and centrifuged again with the same parameters. The membranes are finally suspended in 20 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM sucrose, 1 mM EDTA, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C.

Membranes are solubilized at 3 mg/mL in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 15% glycerol (v/v), anti-protease CLAPA 1X, 4.5% (v/v) Triton X100 and incubated 1h20 at 4 °C under gentle agitation. The solution is centrifuged 40 min at 100,000 xg, 4 °C. The supernatant is loaded onto a Ni²⁺-NTA column pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 15% (v/v) glycerol, anti-protease CLAPA 1X, 4.5% Triton X100, 20 mM imidazole. Resin is washed with 20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1.3 mM DDM and 1 mM sodium cholate. Protein is eluted with the same buffer with 200 mM imidazole. Fractions of BmrA are pooled and diluted ten times in the same buffer as previously but without imidazole. The column is equilibrated with 20 mM HEPES-NaOH pH8.0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1.3 mM DDM and 1 mM sodium cholate, and the protein solution is loaded again for a second affinity chromatography. After elution, fractions of BmrA are pooled (typically 10 mL) and concentrated on 50 kDa cutoff Amicon Ultra-15 device at 1,000 xg, 4 °C, until the volume reaches 500 µL. The solution is then injected on a Superdex 200 10/300 column (Cytiva) equilibrated with 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.7 mM DDM and 0.7 mM sodium cholate.

4.2 CryoEM grids preparation and data collection

Purified BmrAE504A was concentrated to 4 mg/mL as described above. Defined concentrations of ATP-Mg²⁺ (25 µM, 70 µM, 100µM, 5 mM final concentrations) are added to a final concentration of BmrA of 25 µM to be applied on the cryoEM grid. For the grid containing Rhodamine6G (R6G), the ligand is also added to a final concentration of 100 µM followed by a 15 min. incubation on ice prior to ATP-Mg²⁺ addition. The mix was incubated 30 min. at room temperature to reach steady state before application on the cryoEM grid.

Ultra-Au 1.2/1.3 grids (Quantifoil) are glow discharged on air for 45 s at 30 mA (Emitech Glow Discharge). A volume of 3.5 µl of the mix is applied on freshly glow discharged grids at 20°C and 100% humidity using a Vitrobot Mark IV (ThermoFischer). Excess liquid is blotted 4 s at blot force 0 and 0.5 s drain time before vitrification in liquid ethane.

Data were collected on 2 Titan Krios at 300 kV equipped with a K3 direct electron detector (ESRF CM01 or Diamond eBIC), or a Talos Glacios equipped with a K2 detector (IBS, Grenoble). Data collection parameters are summarized in SuppTable 1.

4.3 cryoEM data processing

Data were processed using cryosparc v2, v3 and v4 (Structura Bio) over the duration of the project, with the first data collected in Sept. 2019. Movies were submitted to patch motion correction and patch CTF estimation jobs, and particle picking was performed using blob picker (100-200 Å diameter) on a small subset of movies (usually 200) to create initial 2D classes to be used for template picking. Automatic particle picking was then performed on all the movies using the template from previous 2D classification. Mild 2D classification was operated to remove obvious bad particles (ice contamination or detergent micelles) but care was taken to not throw out “broken particles” at this stage. 3D maps are created with *ab-initio* reconstruction job asking for 7 models to observe the whole sample heterogeneity. The number of particles was noted for IF and OF classes to calculate their ratio (Figure 1). Each map was then individually further refined using several rounds of hetero-refinement and non-uniform refinement until the highest resolution was reached. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, leading to the final one displayed. Each job was computed with or without C2 symmetry to evaluate the impact on the maps; this is especially important for the datasets containing R6G to ascertain its density. In some cases, particle expansion followed by local refinement was performed to enhance the quality of the maps at the R6G binding site without imposing symmetry.

The general data processing pipe was similar but some specificities were used for some datasets, to reach the best results possible. Summaries of data processing are shown in supp-Figures 1-8. Notably, for the data set E504A^{apo-100 μ MATP} an additional local CTF refinement was performed and a mask without detergent belt was applied. For data set E504A^{apo-25 μ MATP} a mask without detergent belt and one NBD was used. For datasets showing discrete heterogeneity but where one conformation couldn't be resolved to high resolution, the reconstructions clearly show in which category (IF or OF) the transporter belongs (E504A^{apo-25 μ MATP}, E504A^{R6G-25 μ MATP}, E504A^{R6G-70 μ MATP}). These reconstructions were used to count the number of particles and thus derive percentages of populations, but no atomistic model was built.

4.4 Model building

For the outward facing conformations, models were built using the previous OF structures of BmrA in absence or presence of R6G (PDB: 6R72 and 6R81 [13]). Several cycles of manual building in Coot and real-space refinement using phenix.refine were performed. Final models were checked for rotamer and Ramachandran outliers.

For IF conformations, the first reconstruction was achieved before the opening of the AlphaFold database. The model was built using the OF conformation, with manual deformation of trans-membrane helices to match the density, using coot and ISOLDE, and several rounds of refinement in Phenix until a model was correctly built. Shortly after, the AlphaFold database was released and the BmrA model, which was generated in IF conformation, was also used for comparison and model building. It turns out that the conformation created by AlphaFold is more closed compared to the IF reconstruction experimentally obtained, thus distortions of that model was also needed. It was also used for comparison with our model building to ascertain the registry, which was identical in both models (ours and AlphaFold), and comforted us in residue assignment. For the other models in IF conformation, local modifications were performed by cycles of manual building and refinement as described before. As discussed below, the NBDs undergoes significant movement in the IF conformation, and thus lacks clear electron density for the outmost regions. The core of the NBDs however is clearly defined, with key residues around W413 for example well defined and unambiguous side-chain assignment and positioning. For the outmost parts, the NBDs were placed following the clear model in the OF conformation. Final models and maps were deposited in the PDB and EMDB under the accession code listed in Supp-Table1.

4.5 Variability analysis and variability refinement

For E504A^{apo} and E504A^{R6G}, 3D Variability Analysis (3DVA, Cryosparc) was performed on the particles from the last non-uniform refinement. Resolution was filtered at 6 Å for 3DVA calculation and display for E504A^{R6G}, and at 4.5 Å for E504A^{apo}. Masks from Non-uniform refinement were initially dilated by 20 Å. The 3D variability display job was performed in simple or intermediate modes with similar results. 5 components were asked as output but the main movements are observed in the 3 first components, which were subjected to variability refinement. Each 20 maps originating from 3DVA were input to variability refinement (phenix.varref [18]) along with the final refined model. 50 models were generated for each map, with restraints adapted to the resolution of 3DVA calculations, and only the best model was kept for each map. The resulting file is a model file containing 20 models with atomic coordinates fitted to each map, allowing for a visualization of the model in ChimeraX for detailed analysis. Movies were generated with ChimeraX.

4.6 Molecular dynamics simulations

For each condition E504A^{apo} and E504A^{R6G}, ATP-Mg²⁺ was added on the NBD in its binding-site by superposing the Outward-Facing conformation of BmrA (PDB: 6r82). Proteins were then inserted into a bilayer using GROMACS (??) and equilibrated ... MD simulation were carried out using Amber36 (??) force field for 700ns and performed in triplicate.

For each condition E504A^{apo} and E504A^{R6G}, ATP-Mg²⁺ was added on the NBD in its binding-site by superposing the Outward-Facing conformation of BmrA (PDB: 6r82). MD simulations were performed for these models using the Amber 14:EHT force field implemented in the MOE software [46]. A lipid bilayer surrounding the transporter composed of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-1-glycerol with a respective ratio of 3:1 was generated with the MOE lipid generator, using the PACKMOL-Memgen approach [47-49] TIP3P water molecules [50, 51] were added, as well as Na⁺ and Cl⁻ ions in order to simulate a 0.1M ionic force, and the pH was set at 7.4. Standard Amber 14:SB parameters were used for MD in amber version 22 suite software [52]. A quick minimization was performed prior to the start of the MD simulations. The geometry of all the molecules, bonds, and charges was then checked using the structure preparation tool in MOE, in order to start the molecular simulations. After a preliminary equilibration phase, 700 ns NTP molecular simulations were performed in triplicate. A frame was saved every 200ns, leading to a total of 3500 frames for each simulation. During MD simulation temperature (300K) a pressure (1 atm) were kept constant (NTP).

4.7 Ligand binding

R6G, Doxorubicin, Hoechst33342 and Vincristine binding were carried out by probing the intrinsic fluorescence change as a function of ligand concentration. Fluorescence was recorded on a SAFAS Xenius spectrophotofluorimeter set up at a constant photo multiplier voltage of 570 V. Tryptophan residues or N-acetyl tryptophan amide (NATA) used as negative control were excited at 290 nm, and their fluorescence emission spectra were recorded between 310 and 380 nm, with a 5-nm bandwidth for excitation and emission. Experiments were done in a quartz cuvette in a final volume of 200 μ L, in which increasing amounts of ligand were added. Resulting emission curves were integrated and deduced from the same experiments carried out with NATA, used at the same concentration than that of BmrA tryptophan residues. Data were plotted as a function of ligand concentration.

4.8 Reconstitution into liposomes

300 μ L of *E. coli* total lipid extract (Avanti Polar lipids) in chloroform at 25 mg/mL were placed into a 50-mL glass balloon and evaporated using a gentle nitrogen stream while turning the balloon to create a monolayer, under a hood. The monolayer was resuspended and solubilized by addition of 300 μ L of lipid buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl) supplemented by 75 μ L DDM at 10 % (w/v), and vortexing at high speed for 5 minutes. The balloon was then placed on a gentle rocker at room temperature for 1h. BmrA purified in the DDM/Cholate mixture was added to 100 μ L of solubilized lipids to ensure a molar ratio 1 BmrA dimer per 3000 lipids (considering an average MW_{lipids} = 750 g/mol, e.g. 40 μ L of BmrA at 2.8 mg/mL). The solution was completed to 500 μ L with lipid buffer and incubated 45 min. at room temperature under gentle agitation. Detergents were then removed by 3 additions of 40 mg pre-activated biobeads, each followed by an incubation of 1h at room temperature under gentle agitation between each biobead addition. The final proteoliposomes solution was then extruded by passing 11 times through a 400-nm membrane filter (Avanti Polar Lipids). These final

proteoliposomes were kept at 4°C and used immediately. BmrA retains its activity during 1 week in these conditions.

4.9 ATP hydrolysis assay

The ATPase activity of BmrA was measured as previously described[13]. The protein in solution in 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.7 mM DDM and 0.7 mM Na cholate was diluted in the ATPase activity assay buffer containing a mixture of 0.7 mM DDM and 0.7 mM Na cholate, and the ATPase activity recorded. ATP hydrolysis was measured using an enzymatic coupled assay, where ADP is regenerated in ATP by the Pyruvate kinase at the expense of PEP and generating pyruvate. Pyruvate is reduced into lactate by the Lactate dehydrogenase by oxidizing NADH into NAD⁺. The disappearance of NADH was followed by absorbance at 340nm, indicative of ATP hydrolysis. Initial and maximum velocity were recorded. To represent the increase in velocity, the difference between velocities in presence and absence of R6G were normalized to the velocity in absence of R6G. ATPase activities were conducted at fixed ATP-Mg²⁺ concentration and varying R6G concentrations, or at fixed R6G concentration and varying ATP-Mg²⁺ concentrations. All ATP hydrolysis assays were realized with 4 µg wild-type and E504A inactive mutant in different amphipathic environments (detergent, liposome, inverted membrane vesicles). R6G was pre-incubated with the protein at 50 µM for 10 min at 25°C.

4.10 Transport experiments

Transport assays followed the fluorescence of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) or doxorubicin (Sigma-Aldrich) during their transport by BmrA across the membrane with different ATP-Mg²⁺ (Sigma-Aldrich) concentrations. The set-up experiment consisted of 50 µg *E. coli* inverted membrane vesicles containing overexpressed BmrA mixed with 1 micromolar of fluorescent molecules (Hoechst 33342 or doxorubicin, stock solution resuspended in water). Transport was initiated by adding a certain concentration of ATP-Mg²⁺ and monitored at 25 °C in 1 mL quartz cuvettes, recording the fluorescence on Xenius fluorimeter (SAFAS) at 468 nm with a bandwidth of 10 nm upon excitation at 355 nm with a bandwidth of 10 nm for Hoechst 33342 and at 593 nm with the bandwidth of 10 nm upon excitation at 468 nm with the bandwidth of 10 nm. Different ATP-Mg²⁺ concentrations were tested, of 20, 50, 100, 200, 300, 700, 1000 and 2000 µM. The transport buffer was made of 50 mM HEPES-NaOH pH = 7.5 (Sigma-Aldrich), 8.5 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), supplemented by 5 mM NaN₃ (Sigma-Aldrich) and 2 mM Na₂S (Sigma-Aldrich) which are inhibitors of electron transport chain. Transport assays with E504A inactive mutant were also performed to visualize some potential non-specific transport. All experiments were done in duplicate of duplicates. Standard curves were performed to estimate the amount of drug transported. They were performed on the same inverted membrane vesicles, or in pure liposomes with a fixed lipid concentration (The liposomes concentration was set to reach the same maximum fluorescence for the ligand as in membrane vesicles, which resulted in 10 mg/ml lipids). The curves were performed from zero to the maximum amount of substrate added, in small increments.

Acknowledgements

We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of beam time on CM01 and we would like to thank all the staff for assistance. We thank FRISBI (PID-169 and -202) and INSTRUCT (PID-24618) for funding access to microscopes. This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC center (ISBG; UAR3518 CNRS-CEA- UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by FRISBI (ANR- 10-INSB-05-02 & project ID 160 to P.B.) and GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Écoles 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). We thank Daouda Traoré for personal time on the ESRF CM01 Titan Krios. This project was funded by ANR-19-CE11-0023-01 for VC, PF, AG, SM, CO and JMJ, and ANR-23-CE11-0031-01 for VC, PF, SM, LM, LZ and GS. The authors wish to thank Elise Kaplan for sharing models of BmrA WT and C582, and Alexis Michon with his constant IT help during the course of this article.

Author contribution: VC initiated the study. AG and LM expressed all the proteins, purified them and prepared them for cryoEM data acquisition and enzymologic characterization. AG processed all the data for the apo form and R6G-bound proteins, constructed all the models and performed 3DVA calculations and movies. AG performed the ATP binding assay for E504^{apo} and in presence of R6G. LM performed all the other biochemical and enzymologic analysis. SM prepared protein and membranes. EZ and GS prepared all the grids and observed them on the IBS GLACIOS with overnight data collection for 2D classes, and performed some data collection on the CM01 KRIOS. CO and JMJ performed early analysis on ATPase stimulation by drugs at low ATP concentrations. EK, CO and JMJ shared the WT and C582 structures. EB and RT performed MD simulations and logP analysis. JM performed analysis of the varref bundles. VC performed the variability refinement analysis. PF and VC supervised the whole project. All authors participated in writing the manuscript.

References

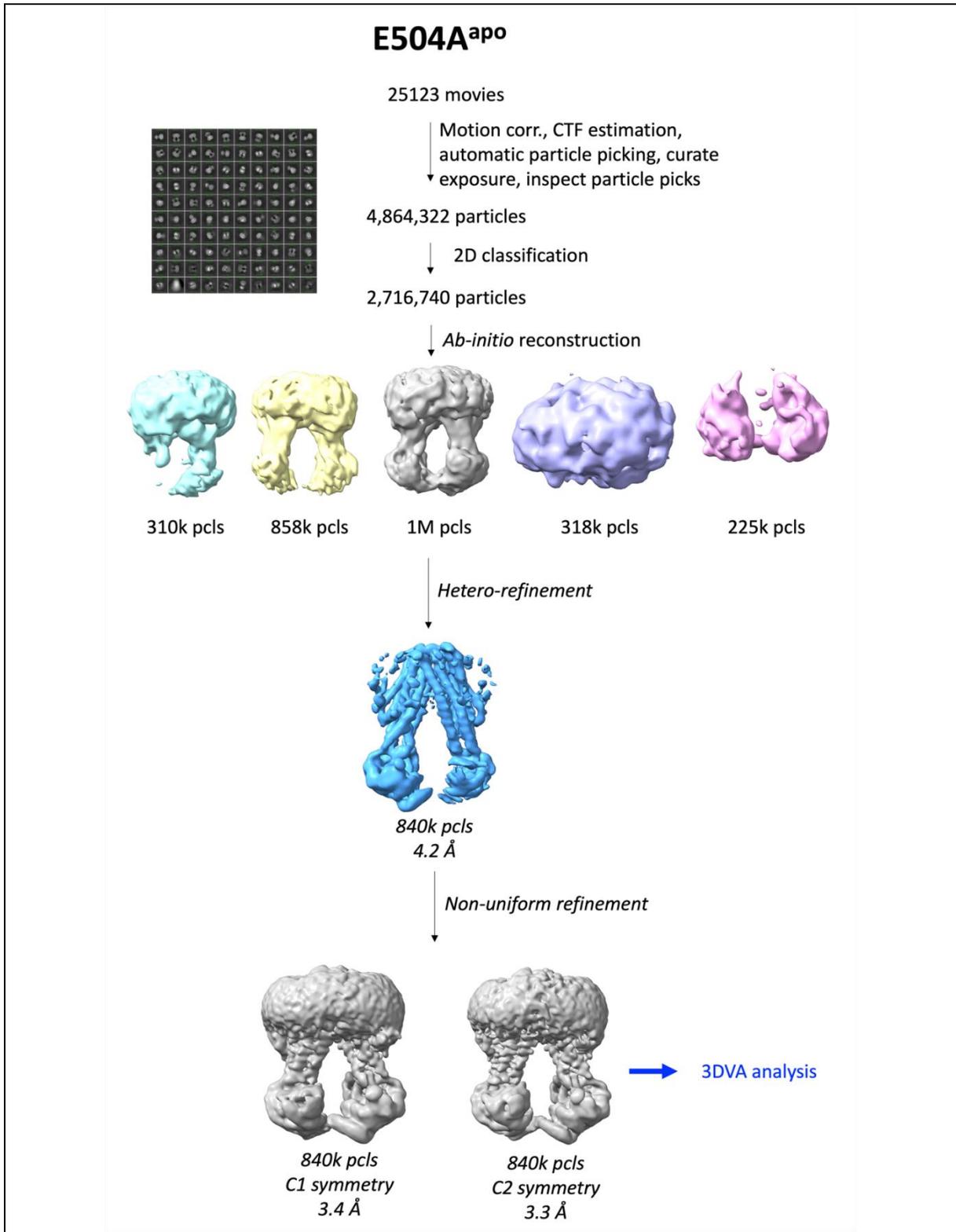
1. Orelle, C., K. Mathieu, and J.M. Jault, *Multidrug ABC transporters in bacteria*. Res Microbiol, 2019. **170**(8): p. 381-391.
2. Robey, R.W., et al., *Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer*. Nat Rev Cancer, 2018.
3. Schmalstieg, A.M., et al., *The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(9): p. 4806-15.
4. Gewering, T., et al., *Tracing the substrate translocation mechanism in P-glycoprotein*. Elife, 2024. **12**.

5. Fan, W., K. Shao, and M. Luo, *Structural View of Cryo-Electron Microscopy-Determined ATP-Binding Cassette Transporters in Human Multidrug Resistance*. *Biomolecules*, 2024. **14**(2).
6. Gewering, T., et al., *Mechanism of multimodal substrate translocation in P-glycoprotein*. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.04.28.489897.
7. Moeller, A., et al., *Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters*. *Structure*, 2015. **23**(3): p. 450-460.
8. Alam, A. and K.P. Locher, *Structure and Mechanism of Human ABC Transporters*. *Annu Rev Biophys*, 2022.
9. Locher, K.P., *Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters*. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. **23**(6): p. 487-93.
10. Orelle, C., et al., *Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA*. *Biochemistry*, 2008. **47**(8): p. 2404-12.
11. Steinfeld, E., et al., *Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 2004. **43**(23): p. 7491-502.
12. Krugel, H., et al., *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*, 2010. **313**(2): p. 155-63.
13. Chaptal, V., et al., *Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter*. *Sci Adv*, 2022. **8**(4): p. eabg9215.
14. Lacabanne, D., et al., *Flexible-to-rigid transition is central for substrate transport in the ABC transporter BmrA from Bacillus subtilis*. *Commun Biol*, 2019. **2**: p. 149.
15. Lacabanne, D., et al., *Solid-State NMR Reveals Asymmetric ATP Hydrolysis in the Multidrug ABC Transporter BmrA*. *J Am Chem Soc*, 2022. **144**(27): p. 12431-12442.
16. Javed, W., et al., *Structural insights into the catalytic cycle of a bacterial multidrug ABC efflux pump*. *J Mol Biol*, 2022: p. 167541.
17. Mehmood, S., et al., *Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter in the inward- and outward-facing conformations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012.
18. Afonine, P.V., et al., *Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2023. **1865**(4): p. 184133.
19. Dalmas, O., et al., *The Q-loop disengages from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(44): p. 36857-64.
20. Orelle, C., et al., *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*, 2003. **278**(47): p. 47002-8.
21. Di Cesare, M., et al., *The transport activity of the multidrug ABC transporter BmrA does not require a wide separation of the nucleotide-binding domains*. *J Biol Chem*, 2023: p. 105546.
22. Damm, A., et al., *Mechanosensitivity of an ABC Membrane Transporter Revealed by Single Molecule FRET and Activity Measurement*. *bioRxiv*, 2024: p. 2024.01.24.577054.
23. 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.
24. Alam, A., et al., *Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein*. *Science*, 2019. **363**(6428): p. 753-756.

25. Punjani, A. and D.J. Fleet, *3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM*. *Journal of Structural Biology*, 2021. **213**(2): p. 107702.
26. Tang, W.S., et al., *Conformational heterogeneity and probability distributions from single-particle cryo-electron microscopy*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2023. **81**: p. 102626.
27. Zhong, E.D., et al., *CryoDRGN: reconstruction of heterogeneous cryo-EM structures using neural networks*. *Nature Methods*, 2021. **18**(2): p. 176-185.
28. Dashti, A., et al., *Retrieving functional pathways of biomolecules from single-particle snapshots*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 4734.
29. Punjani, A. and D.J. Fleet, *3DFlex: determining structure and motion of flexible proteins from cryo-EM*. *Nature Methods*, 2023. **20**(6): p. 860-870.
30. Nakane, T., et al., *Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION*. *eLife*, 2018. **7**: p. e36861.
31. Afonine, P.V., et al., *Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement*. *bioRxiv*, 2022: p. 2022.12.23.521827.
32. Steinfeld, E., et al., *Highly efficient over-production in E. coli of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1565**(1): p. 1-5.
33. Orelle, C., L. Schmitt, and J.-M. Jault, *Waste or die: The price to pay to stay alive*. *Trends in Microbiology*.
34. Acar, B., et al., *Distinct Allosteric Networks Underlie Mechanistic Speciation of ABC Transporters*. *Structure*, 2020. **28**(6): p. 651-663.e5.
35. Johnson, Z.L. and J. Chen, *Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1*. *Cell*, 2017.
36. Pourmal, S., et al., *Structural basis of prostaglandin efflux by MRP4*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2024.
37. Novischi, S.Y.P., et al., *Probing the allosteric NBD-TMD crosstalk in the ABC transporter MsbA by solid-state NMR*. *Commun Biol*, 2024. **7**(1): p. 43.
38. Orelle, C., L. Schmitt, and J.M. Jault, *Waste or die: The price to pay to stay alive*. *Trends Microbiol*, 2023. **31**(3): p. 233-241.
39. Gobet, A., et al., *Overexpression of the ABC Transporter BmrA Within Intracellular Caveolae in Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 2022. **2507**: p. 79-89.
40. Martinez, L., et al., *Understanding polyspecificity within the substrate-binding cavity of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. *FEBS J*, 2014. **281**(3): p. 673-82.
41. Ernst, R., et al., *Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps--first come, first served?* *Febs j*, 2010. **277**(3): p. 540-9.
42. Deng, Y., et al., *Measuring and modeling energy and power consumption in living microbial cells with a synthetic ATP reporter*. *BMC Biol*, 2021. **19**(1): p. 101.
43. Fribourg, P.F., et al., *3D Cryo-Electron Reconstruction of BmrA, a Bacterial Multidrug ABC Transporter in an Inward-Facing Conformation and in a Lipidic Environment*. *J Mol Biol*, 2014.
44. Manuse, S., et al., *Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells*. *PLOS Biology*, 2021. **19**(4): p. e3001194.
45. Changeux, J.-P., *Allostery and the Monod-Wyman-Changeux model after 50 years*. *Annual review of biophysics*, 2012. **41**: p. 103-133.

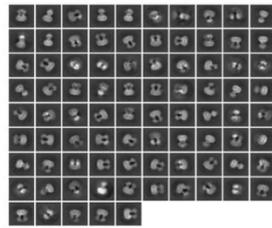
46. ULC, C.c.g., *Molecular Operating Environment*, 2022.02. 2024: 910-1010 Sherbrooke St. W., Montreal, QC H3A 2R7, Canada.
47. Martínez, J.M. and L. Martínez, *Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking*. J Comput Chem, 2003. **24**(7): p. 819-25.
48. Martínez, L., et al., *PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. J Comput Chem, 2009. **30**(13): p. 2157-64.
49. Schott-Verdugo, S. and H. Gohlke, *PACKMOL-Memgen: A Simple-To-Use, Generalized Workflow for Membrane-Protein-Lipid-Bilayer System Building*. J Chem Inf Model, 2019. **59**(6): p. 2522-2528.
50. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. The Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
51. Neria, E., S. Fischer, and M. Karplus, *Simulation of activation free energies in molecular systems*. The Journal of Chemical Physics, 1996. **105**(5): p. 1902-1921.
52. Case, D.A., et al., *Amber 2022*, University of California, San Francisco. 2022.

Supp-Data



Supp-Figure 1: Data processing scheme for BmrA E504A^{apo}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC^{=0.143}$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

E504A^{25μMATPMg}



15,952 movies

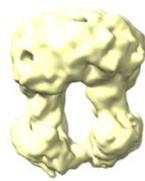
↓ Motion corr., CTF estimation,
automatic particle picking

15,035,070 particles

↓ 2D classification

1,688,439 particles

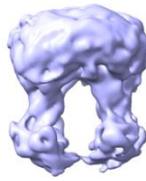
↓ *Ab-initio* reconstruction



201k pcls



243k pcls



526k pcls

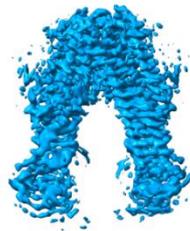


380k pcls



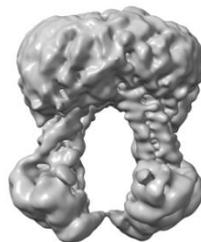
340k pcls

↓ *NU-refinement*

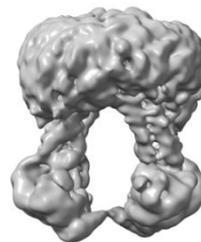


526k pcls
3.8 Å

↓ Local refinement



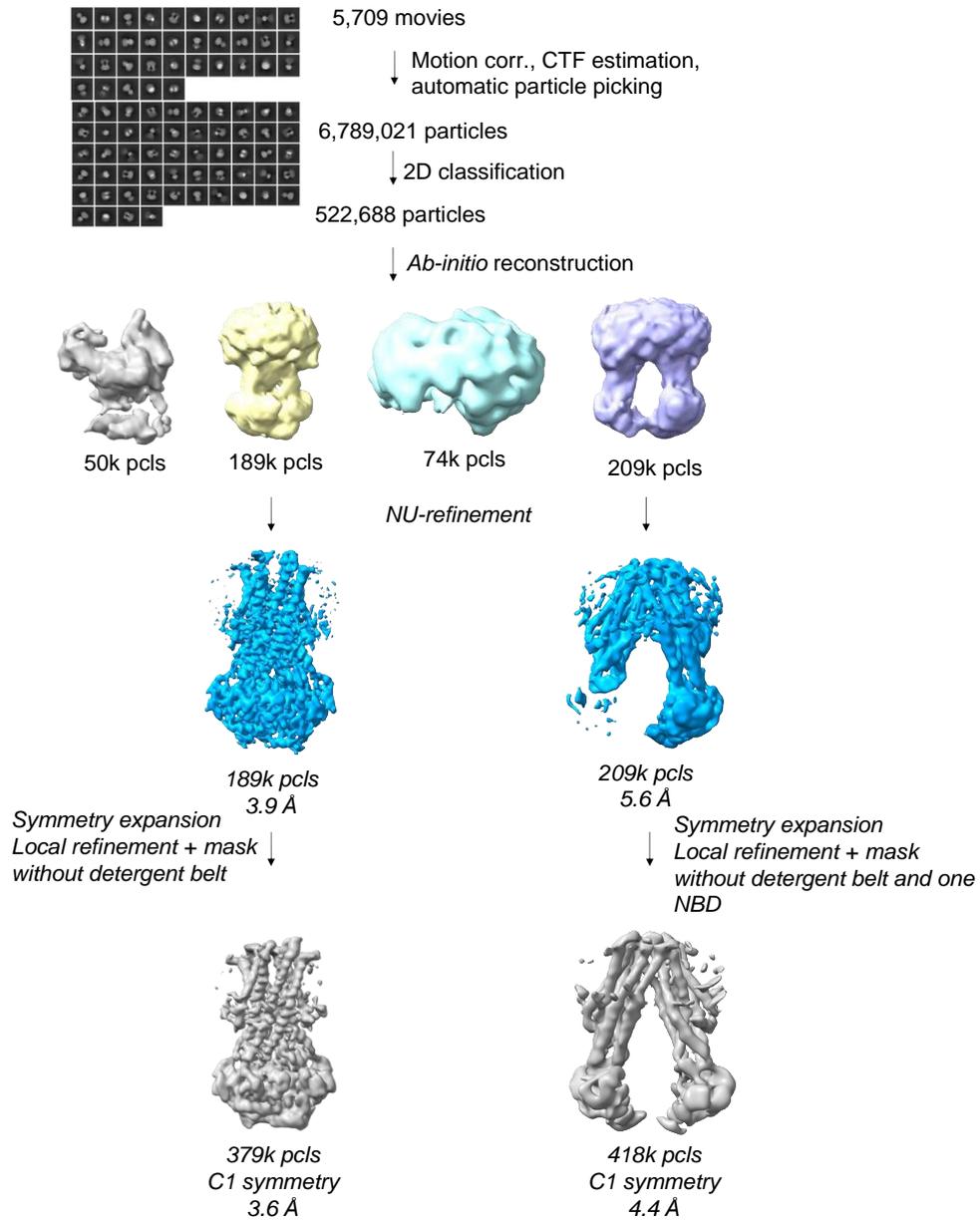
526k pcls
C2 symmetry
3.7 Å



526k pcls
C1 symmetry
3.9 Å

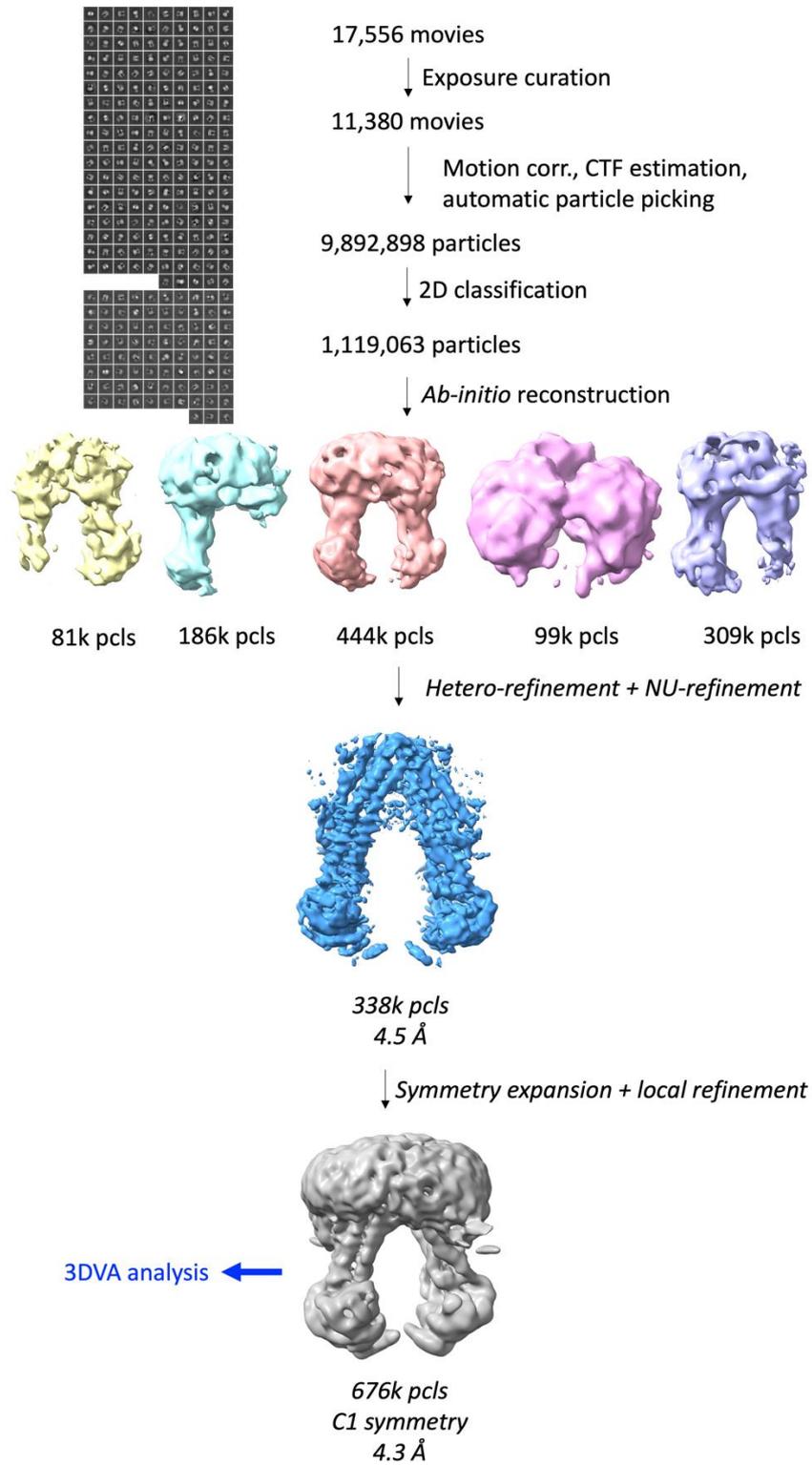
Supp-Figure 2: Data processing scheme for BmrA E504A^{25μMATPMg}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC^{=0.143}$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

E504A^{100μMATPMg}



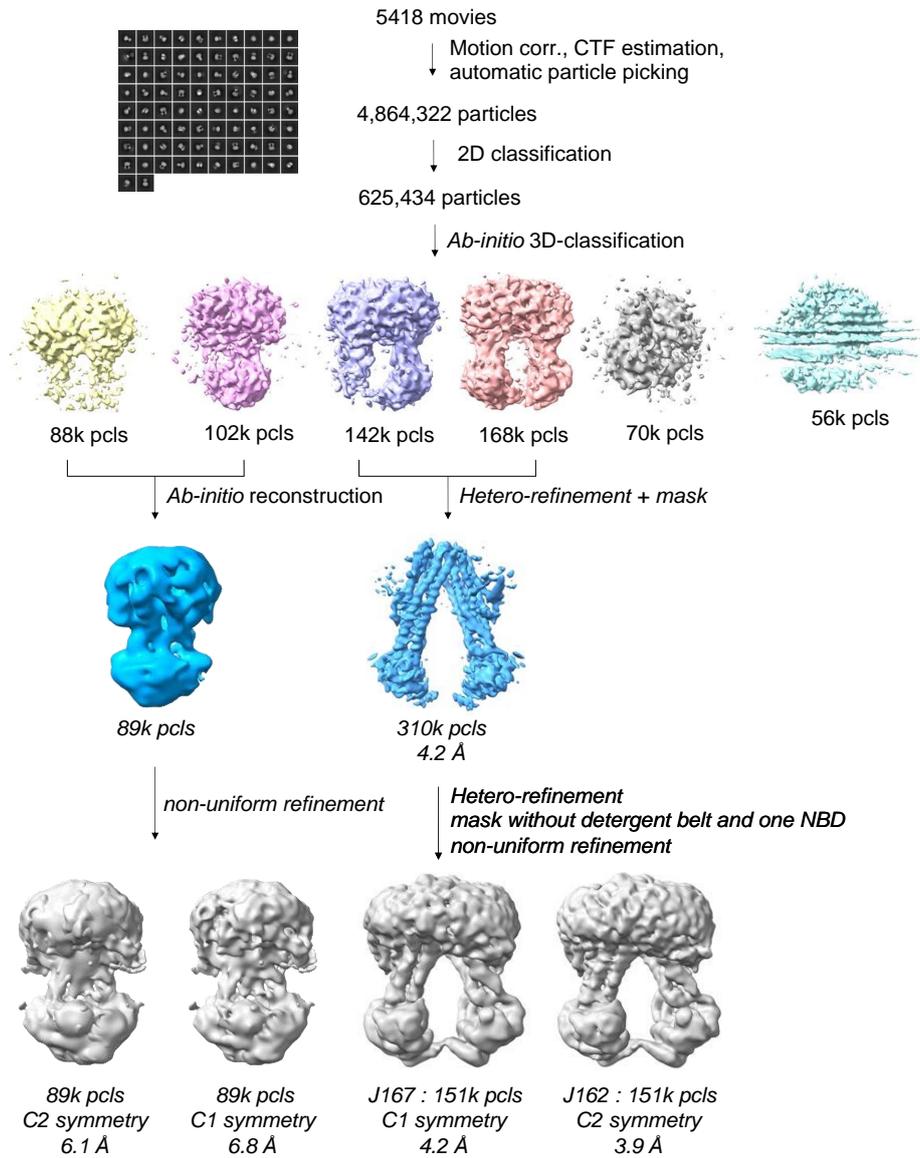
Supp-Figure 3: Data processing scheme for BmrA E504A^{100μMATPMg}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC=0.143$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

E504A^{R6G}



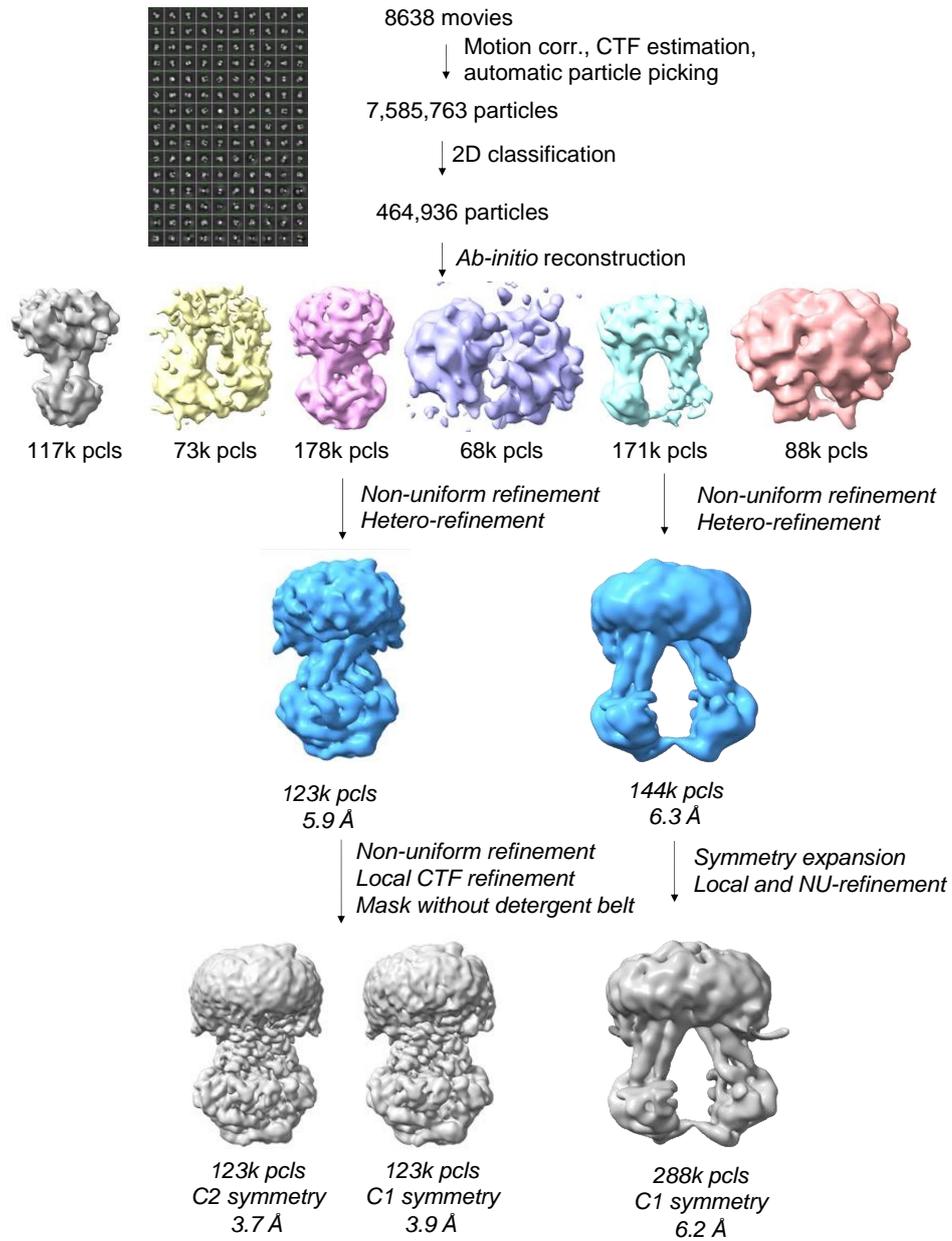
Supp-Figure 4: Data processing scheme for BmrA E504A^{R6G}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC^{0.143}$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

E504A^{R6G-25μMATPMg}

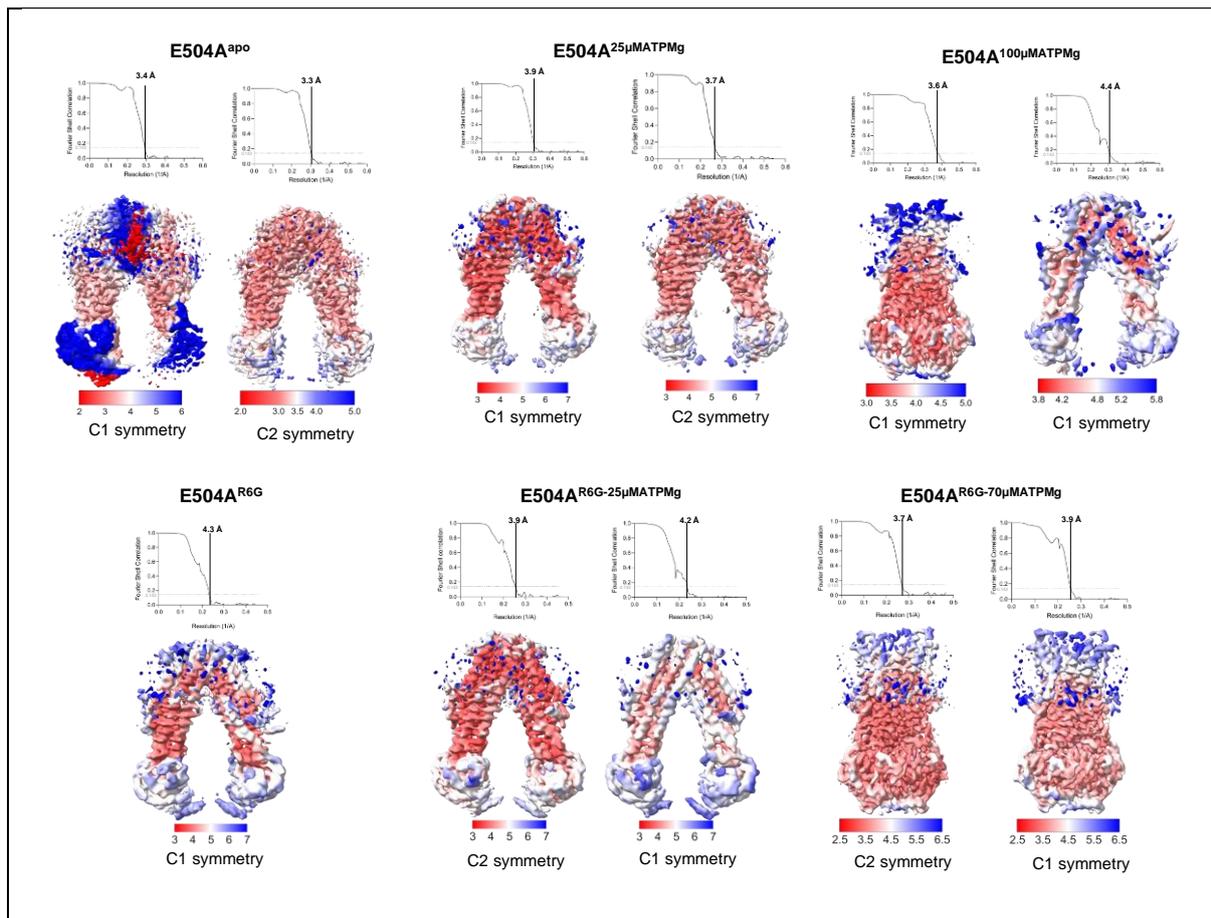


Supp-Figure 5: Data processing scheme for BmrA E504A^{R6G-25μMATPMg}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC=0.143$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

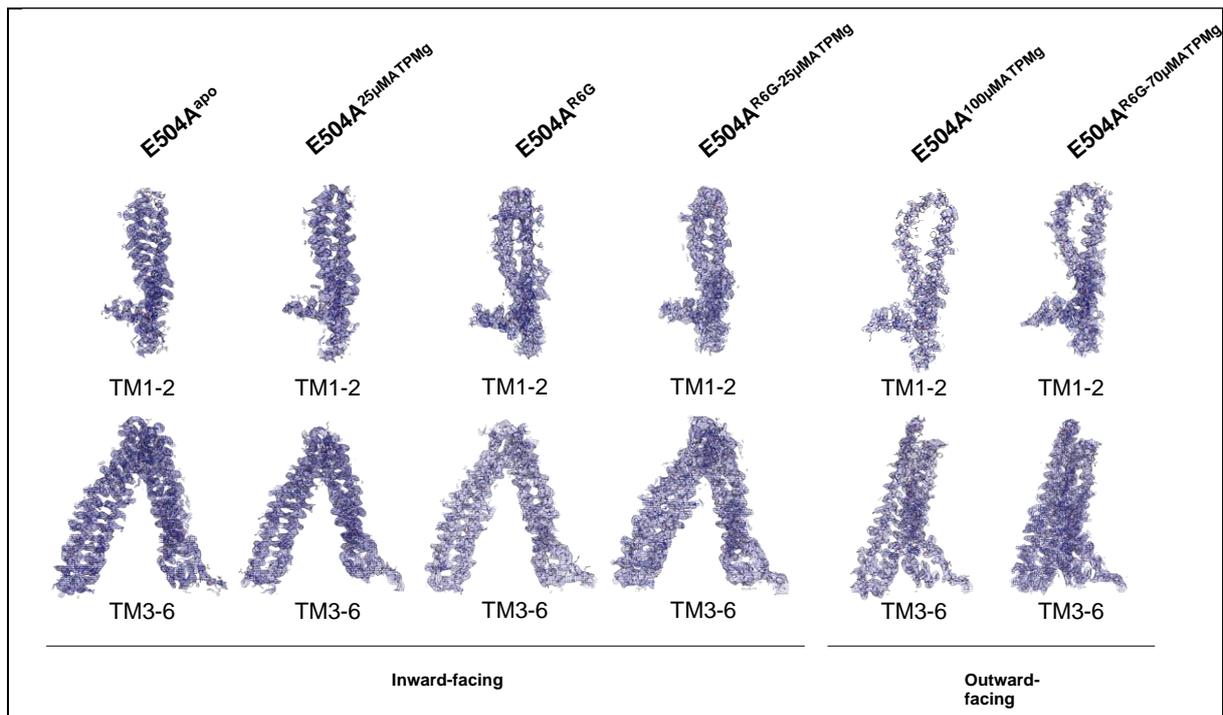
E504A^{R6G-70μMATPMg}



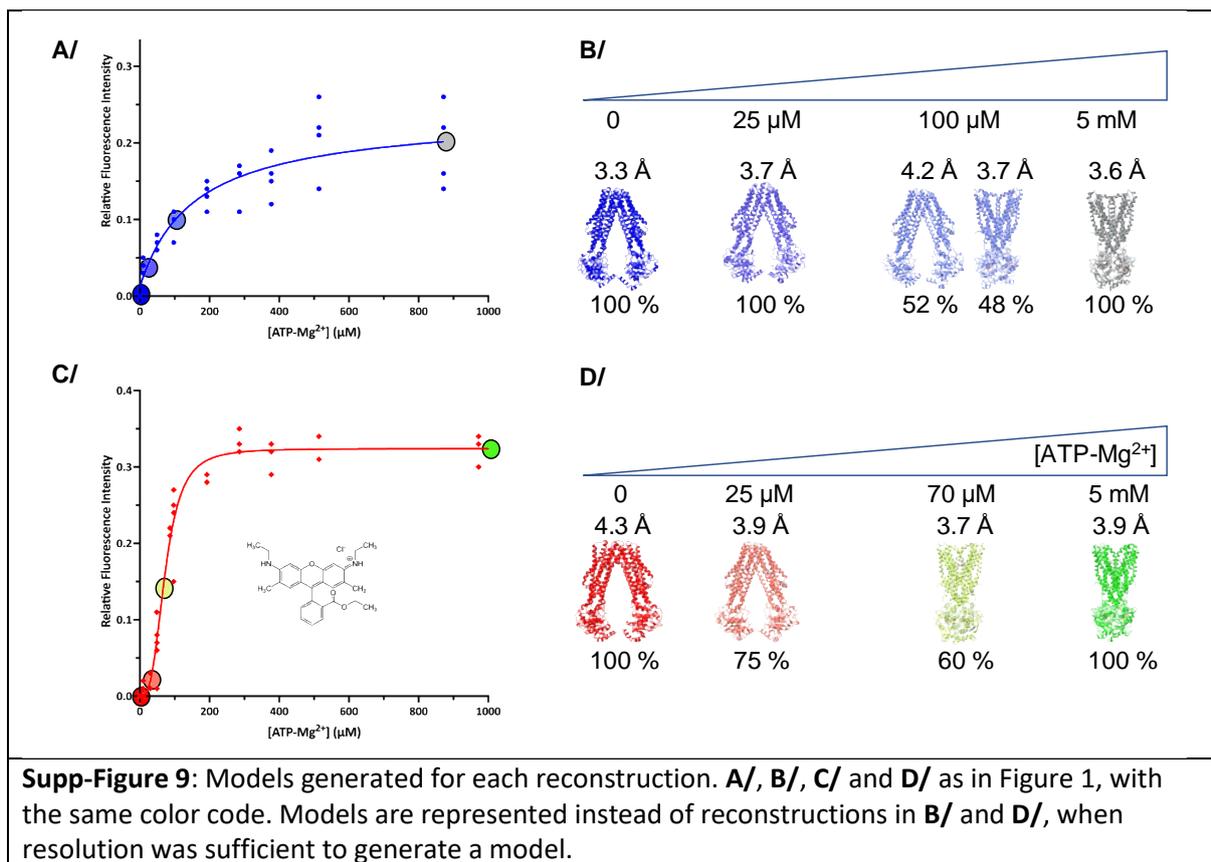
Supp-Figure 6: Data processing scheme for BmrA E504A^{R6G-70μMATPMg}. Particles (pcls) are listed for each step and class, and resolution at $FSC=0.143$ are listed for the latest stages of refinement. Many routes were explored to reach high resolution reconstructions, only the final one is displayed.

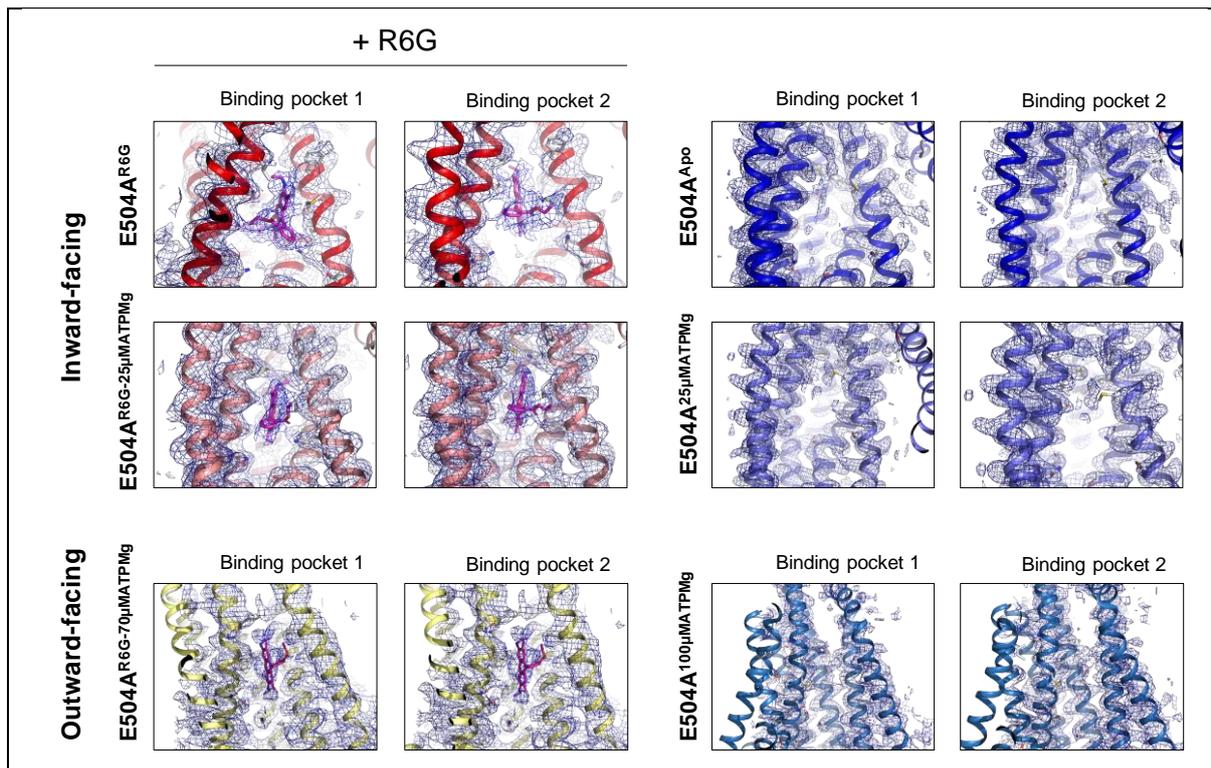


Supp-Figure 7: Local resolutions estimations for each dataset. Without R6G on top, with R6G at the bottom. Resolution scales vary for each dataset to better render the resolution range of each reconstruction.

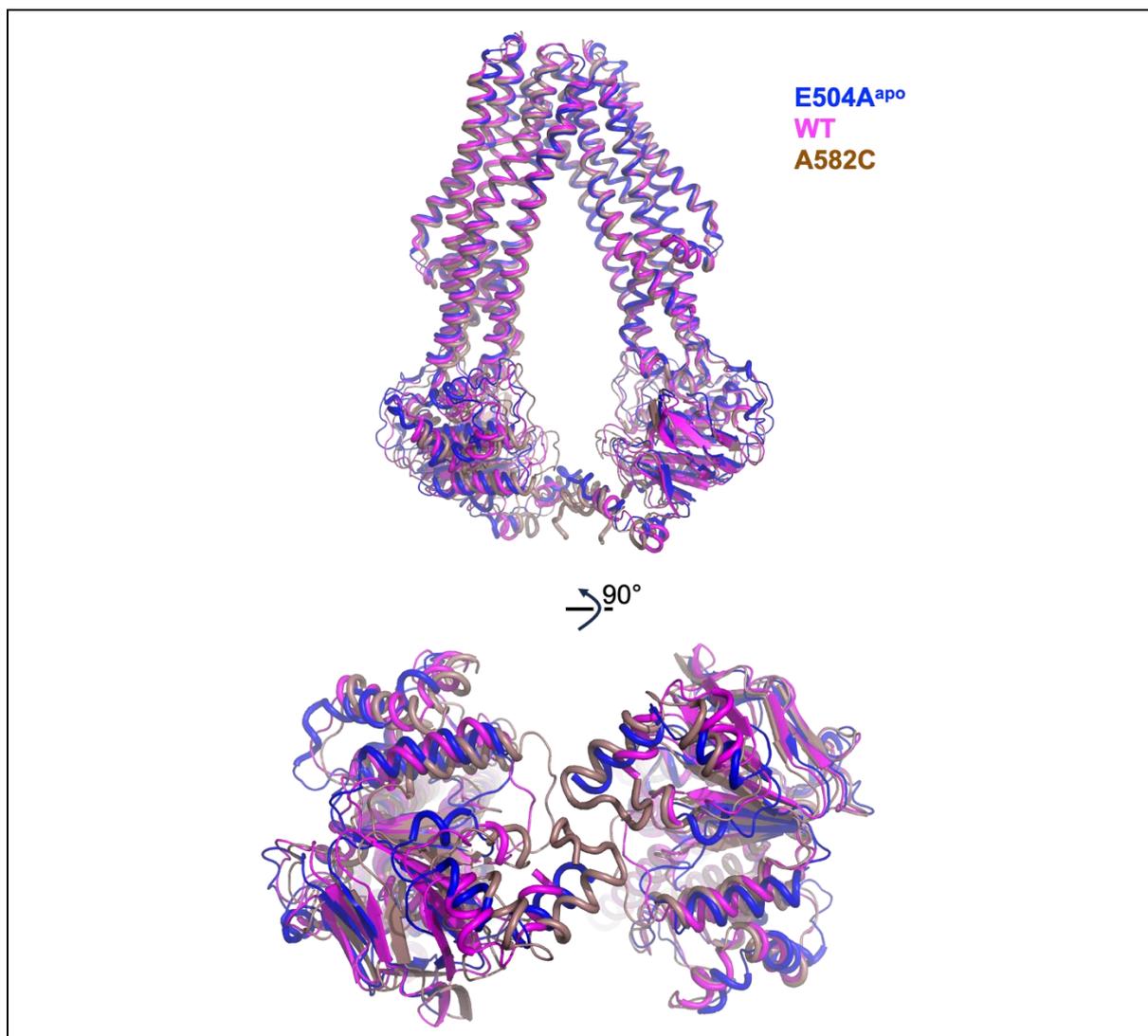


Supp-Figure 8: Coulomb potential maps for the trans-membrane regions of each dataset, exemplifying the backbone and side chains can be placed unambiguously and that the conformational changes induced by substrate binding are indeed reflected by changes in reconstructions.

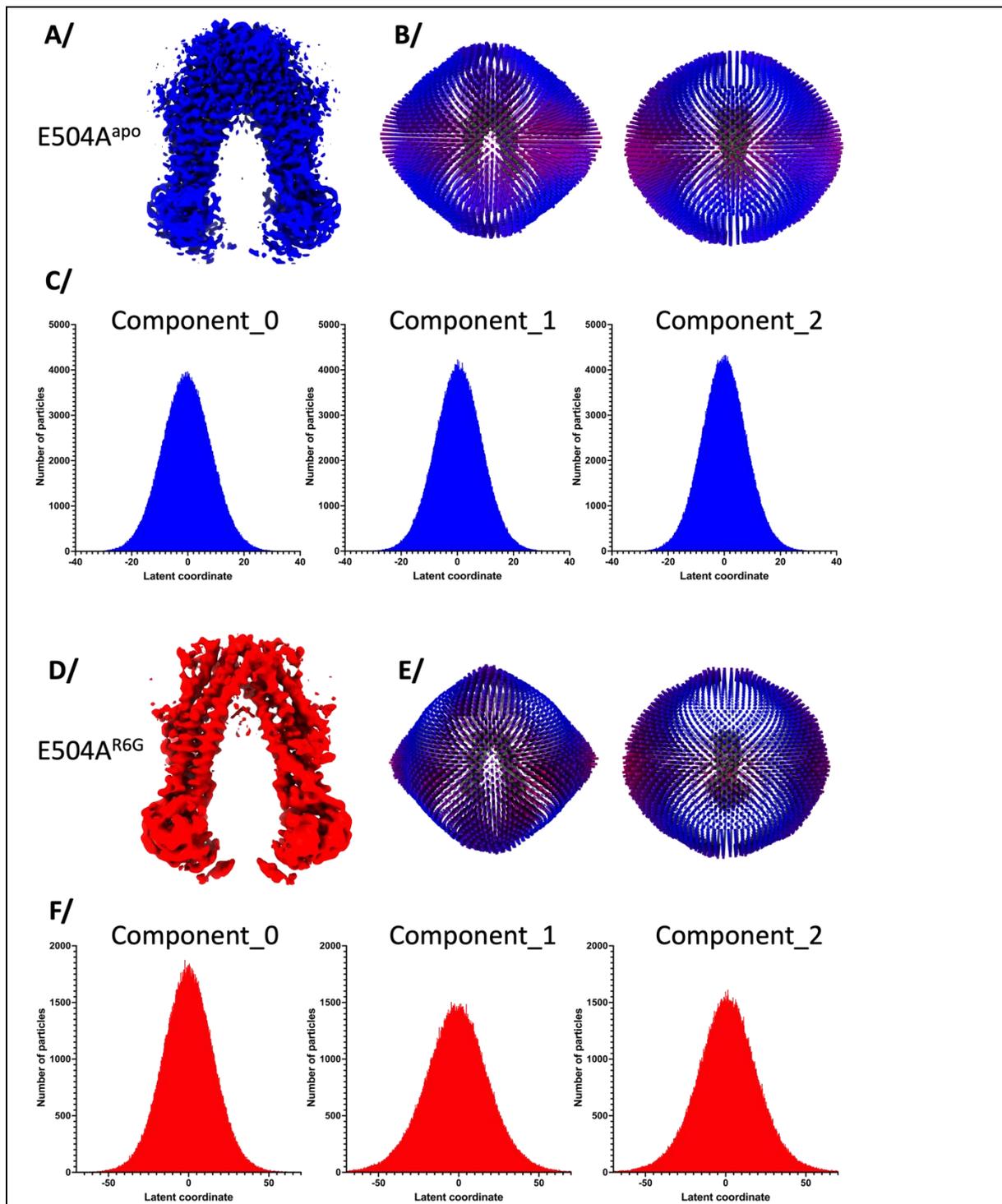




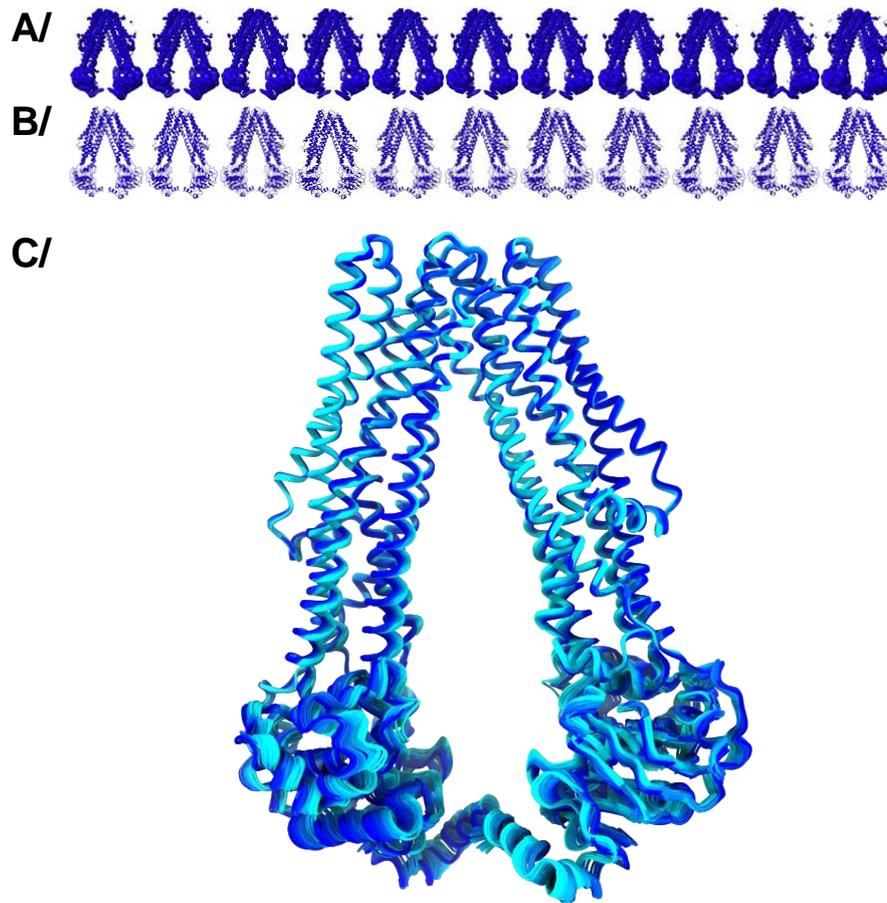
Supp-Figure 10: Coulomb potential maps for R6G in the binding pocket. Left side displays all datasets with R6G present in the solution, right side without R6G. Maps are shown in blue mesh, and the models are displayed in cartoon with the same coloring scheme as in Figure 1. For each dataset, the two halves of BmrA are displayed (binding pockets 1 and 2). R6G is shown as magenta sticks, and its density is indeed present each time R6G is added to the protein.



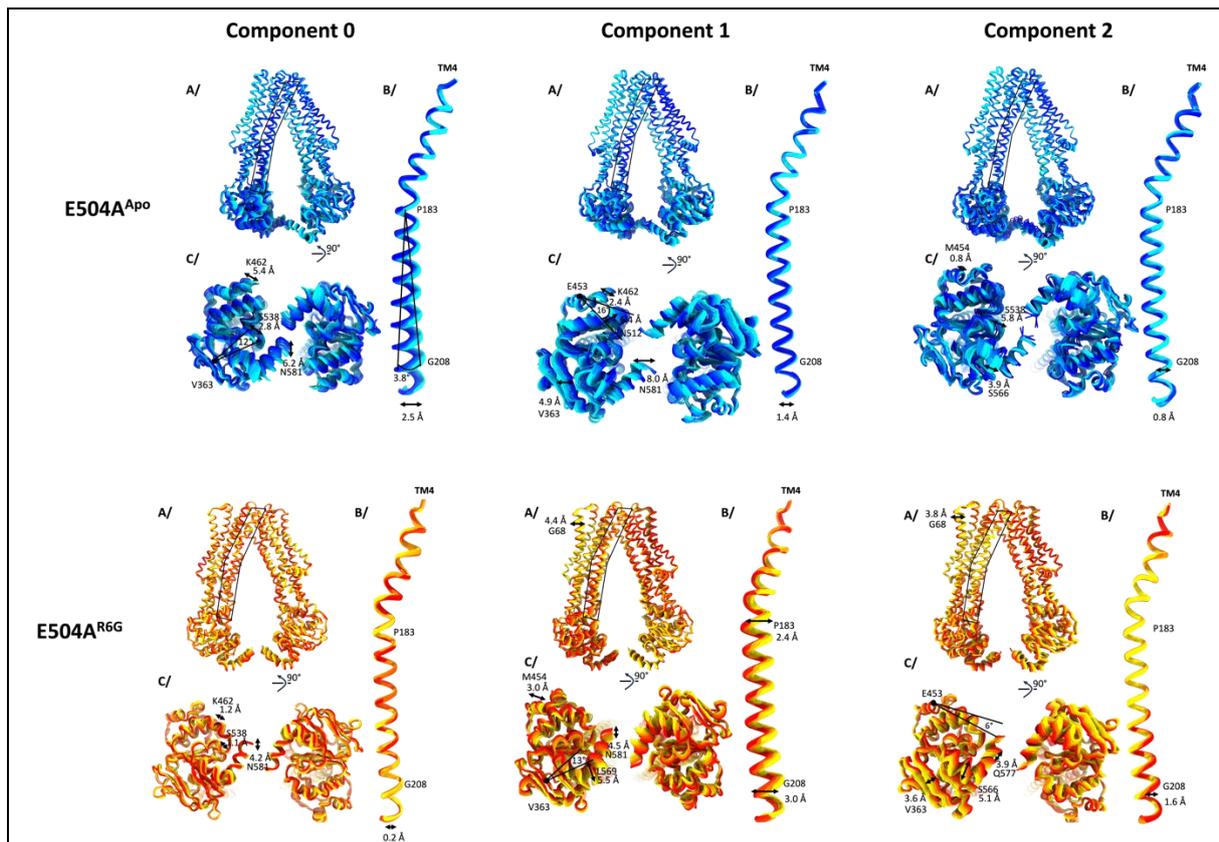
Supp-Figure 11: Overlay of BmrA WT, A582C and E504A in the apo forms. E504A^{apo} is colored in blue according to the color scheme of Figure 1. BmrA WT is colored magenta, and the A582C mutant is colored brown. All proteins are represented in cartoon from the side (top) and from the NBDs (bottom). Overlay performed on residues 1-161 of chain A for each structure with a rmsd of 0.52 Å over 902 atoms and 0.45 Å over 883 atoms, respectively.



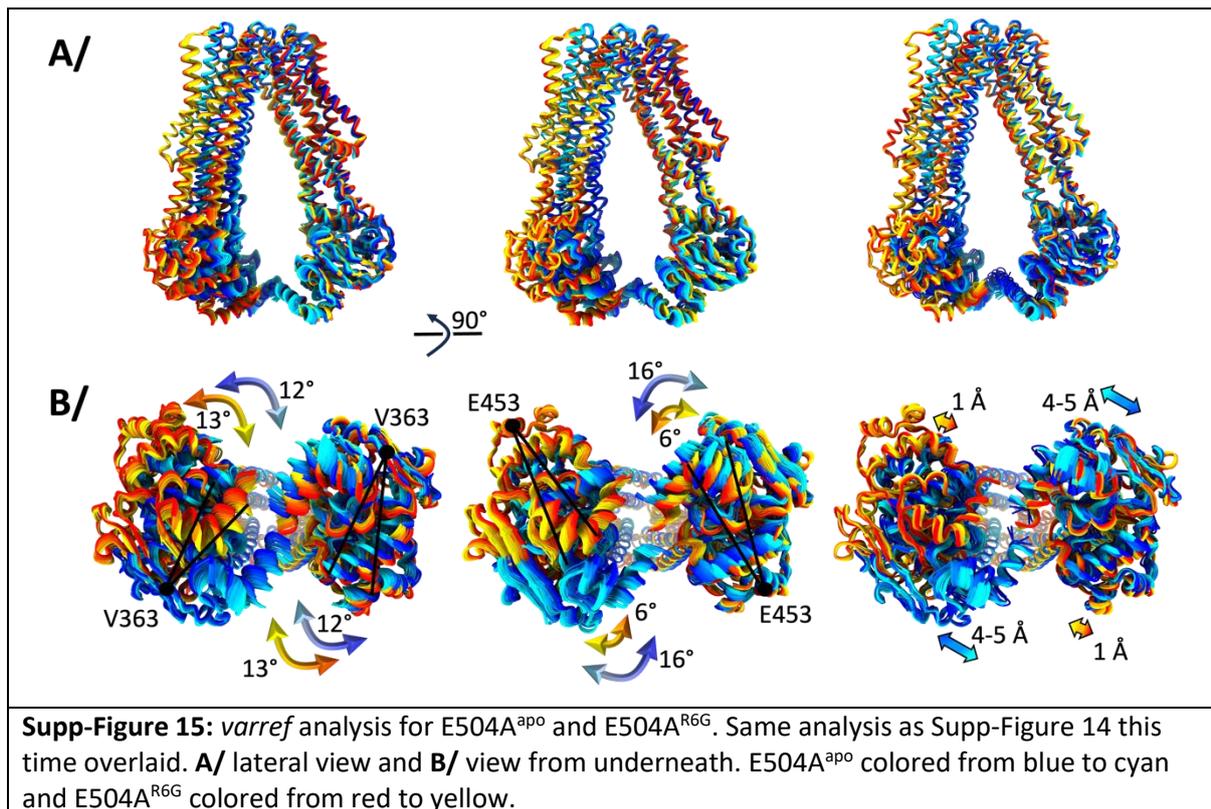
Supp-Figure 12: Particle distributions. A/ E504A^{apo} consensus reconstruction. **B/** 3D representation of particle distribution for the reconstruction; 2 views at 90° are represented. **C/** Particle distribution in latent space, represented per principal component as a function of latent coordinate. **D/ E/ F/** same as above for E504A^{R6G}.



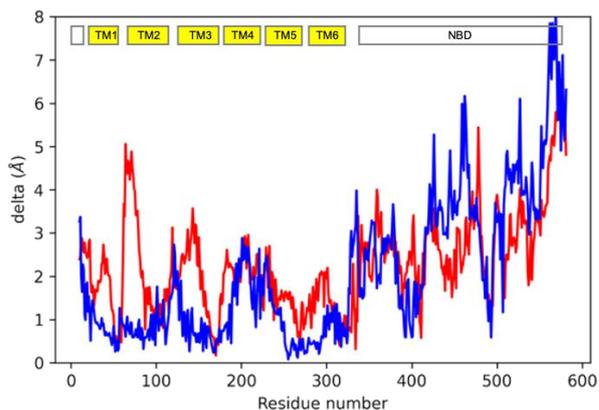
Supp-Figure 13: Explanation of *varref* output from 3DVA analysis. **A/** 11 evenly spaced out of the 20 maps output from 3DVA analysis in cryosparc for the condition BmrA^{apo}. **B/** In each map, a model was refined by *phenix.varref*. The difference in models can be followed at the lowest part of the structure in C-terminal helices. **C/** All 20 models output from *varref* are shown and colored from blue to cyan to show the movement undergone by the protein.



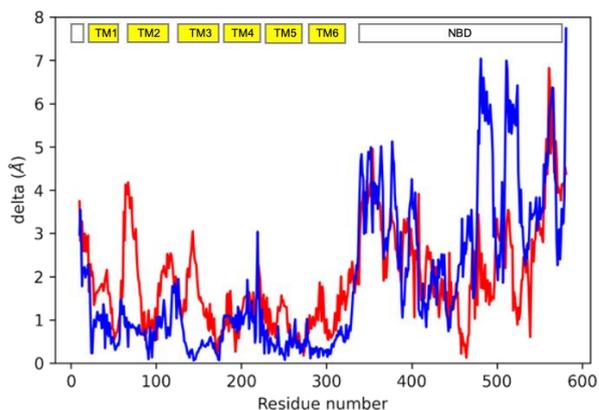
Supp-Figure 14: *varref* analysis for E504A^{apo} and E504A^{R6G}. E504A^{apo} is represented in a gradient of blue to cyan and E504A^{R6G} from red to yellow. For each protein, the movement is decomposed in per principal component during the 3DVA analysis. For each panel **A/** is the lateral view of the full transporter, **B/** is the zoom on TM4, and **C/** is the view of the NBD from under. On each sub-panel, the rotation or translation is displayed and measured.



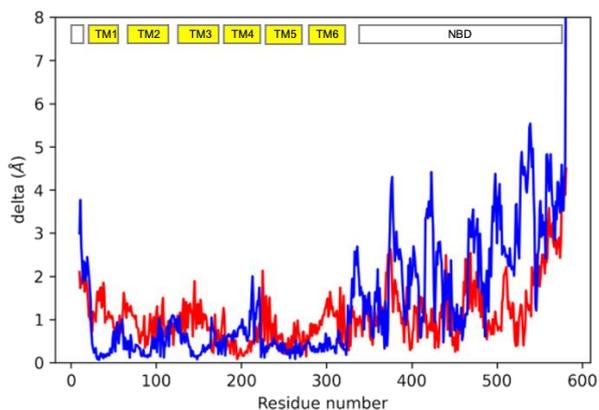
Movement 1



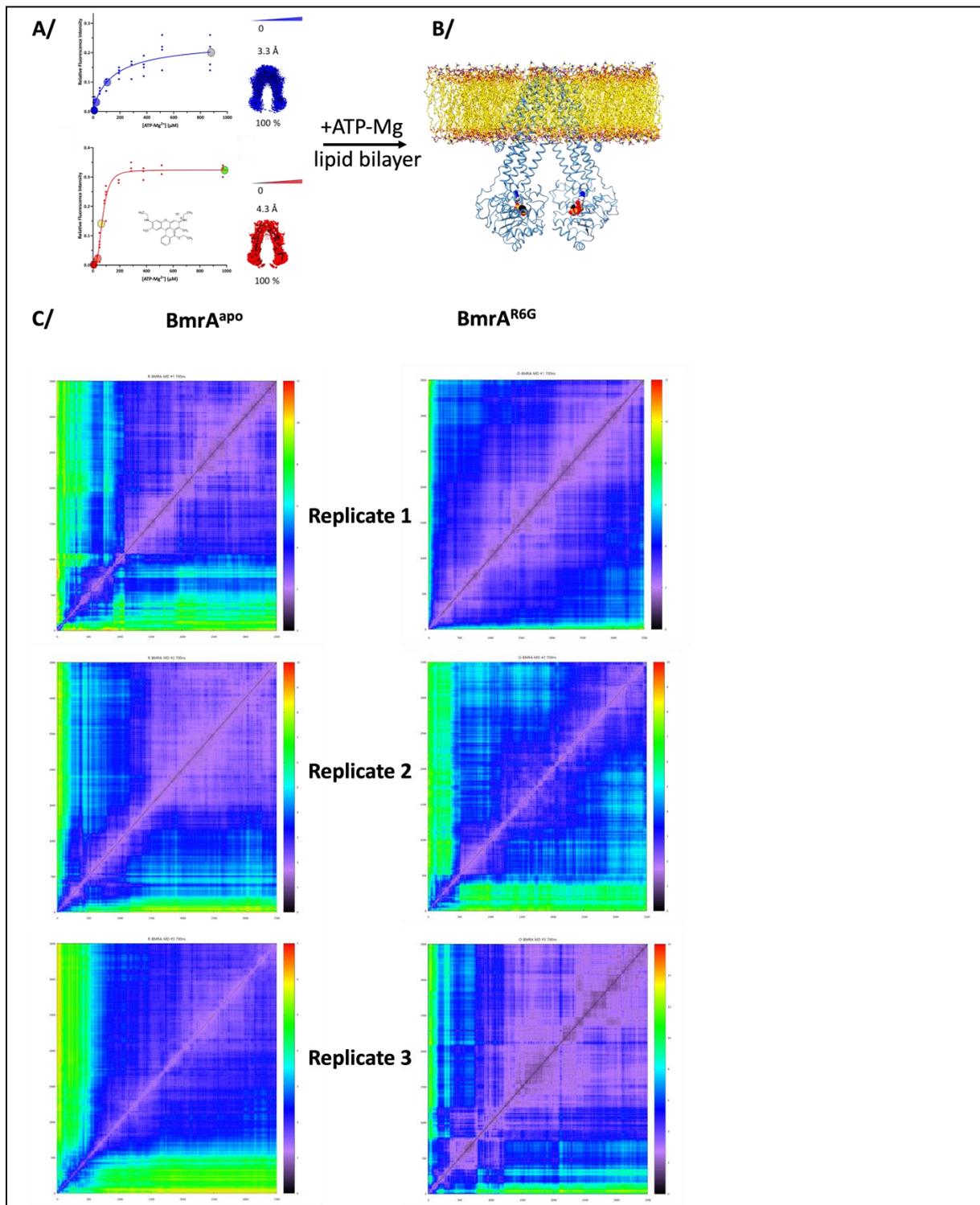
Movement 2



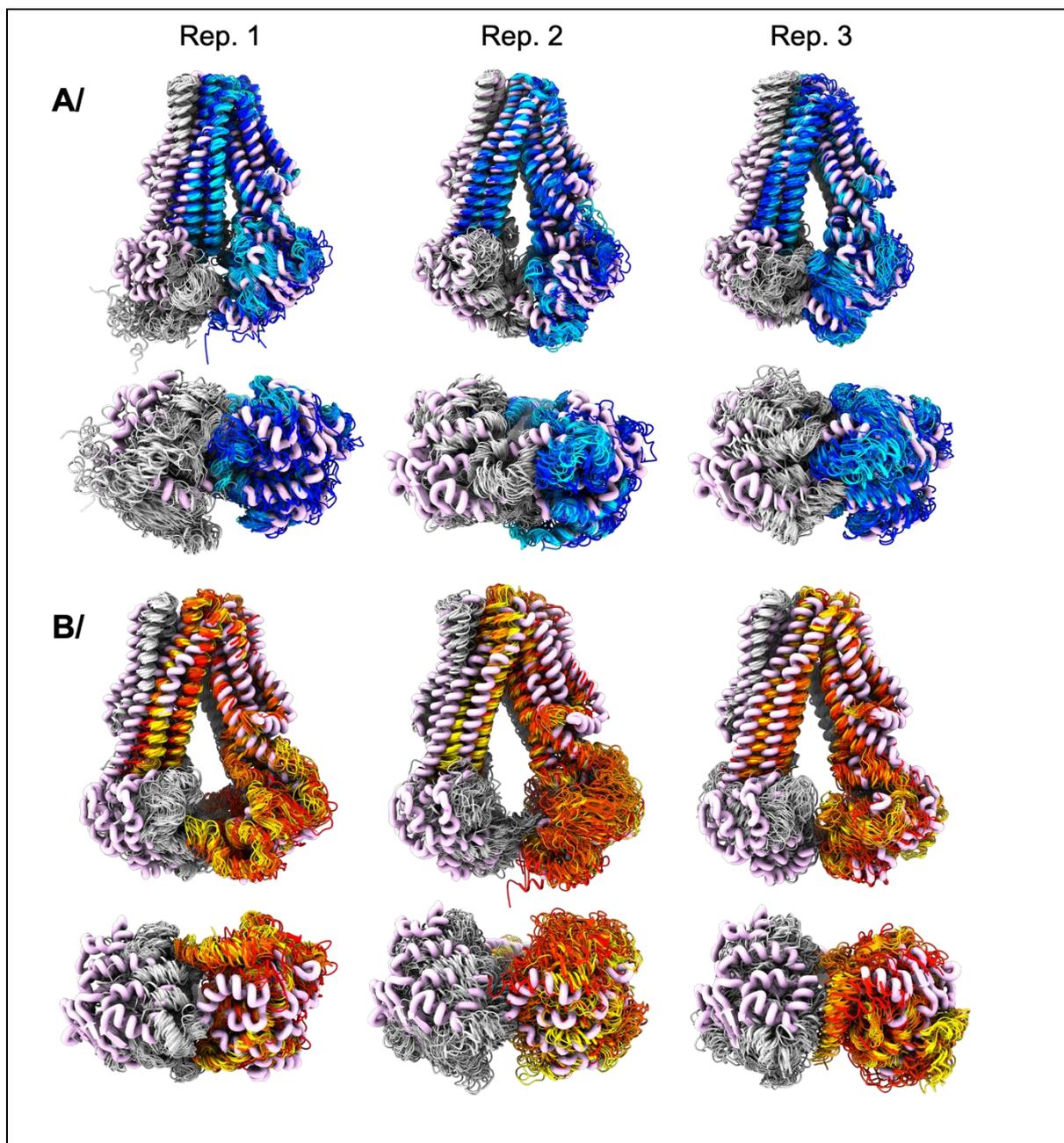
Movement 3



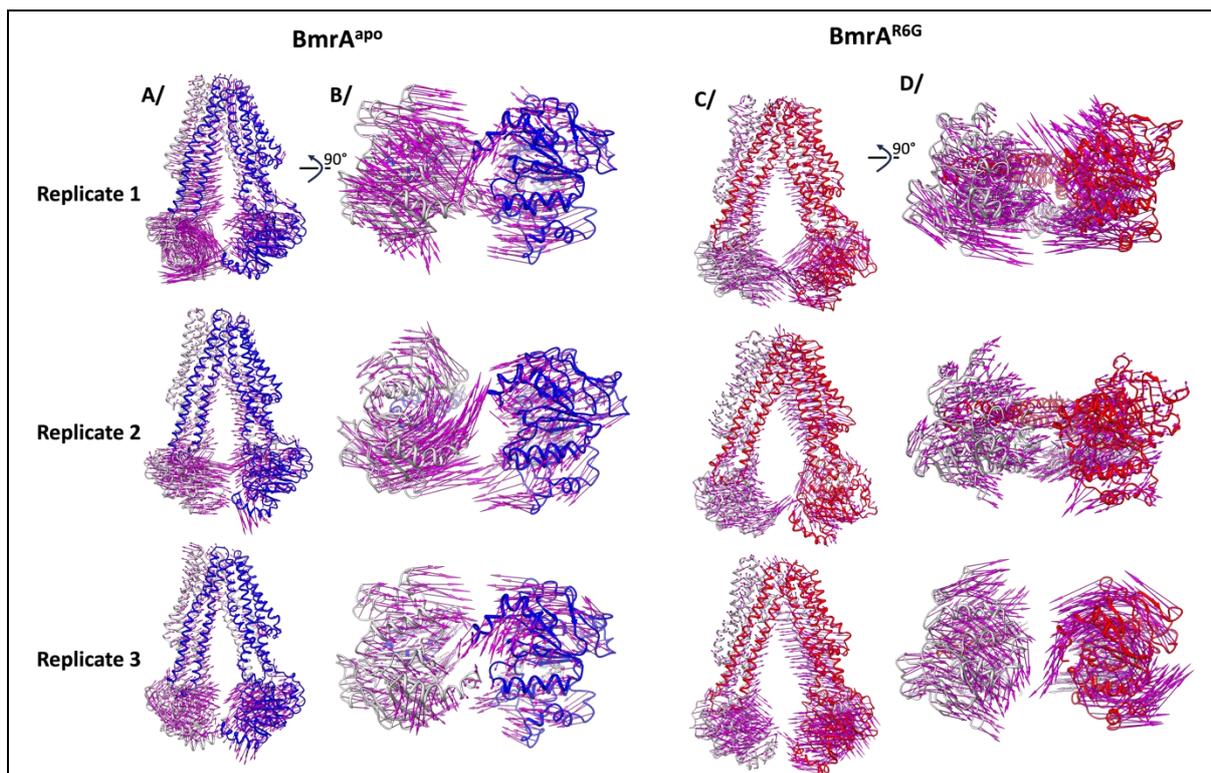
Supp-Figure 16: Structural variations within varref bundles. For each movement described in Figure 3A, rmsf was calculated for each structure within the bundle and plotted as a function of residue number in the chain. An average was performed between chain A and B of the homodimer. BmrA^{apo} is colored blue and BmrA^{R6G} is colored red. The position of each structural element is depicted on top of each graph for reference.



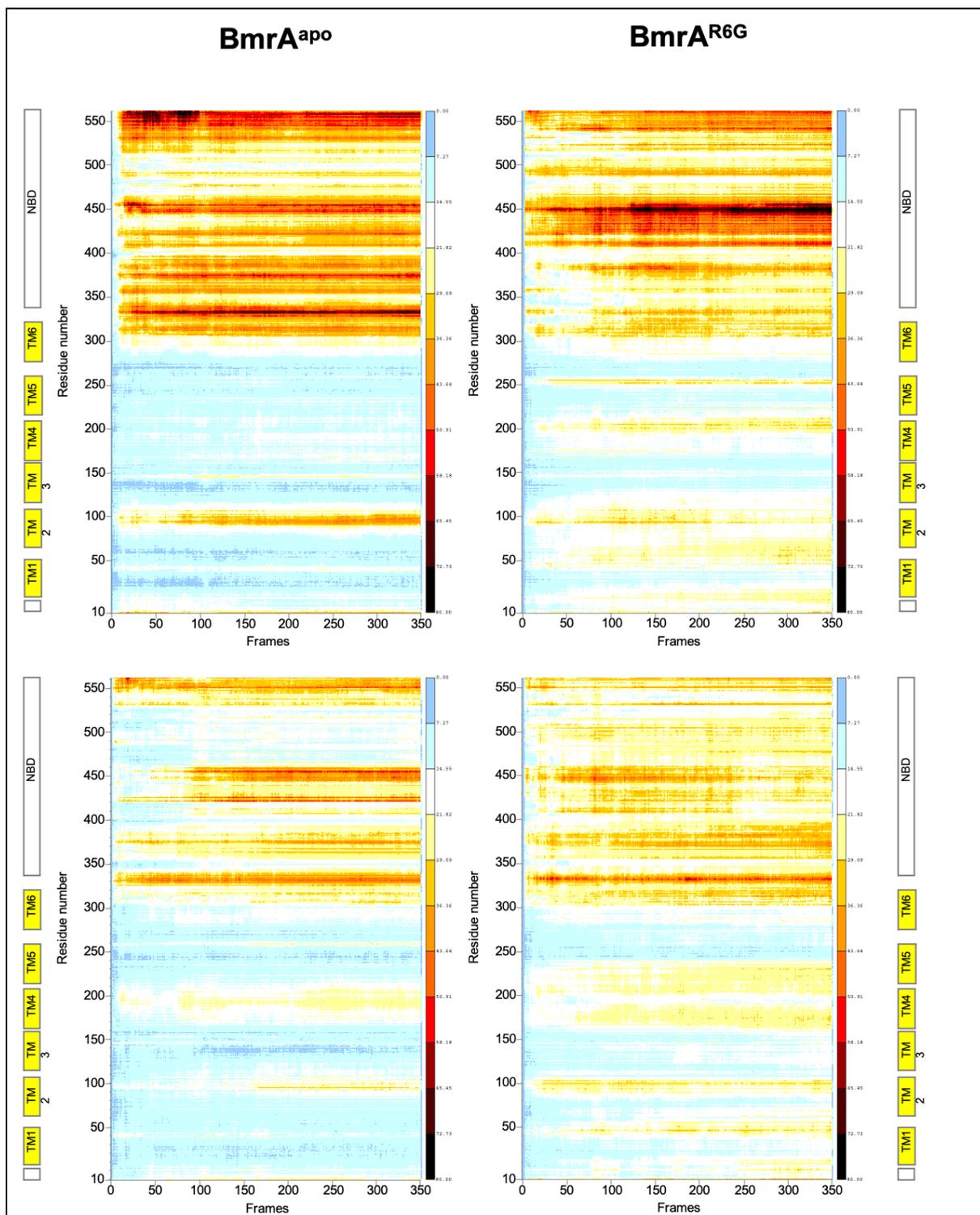
Supp-Figure 17: Global flexibility analysis of MD simulations. **A/** the two initial model used for MD simulations were the models obtained by cryoEM without ATP. **B/** ATP-Mg²⁺ was added in each binding site by superposition with the OF conformation in presence of ATP-Mg²⁺, and both proteins were inserted in a lipid bilayer and equilibrated before simulation. **C/** 2D rmsd plots across the 700ns long of simulations. Three replicates were made for each BmrA form BmrA^{apo} and BmrA^{R6G}. X and Y axes are the frames. Color code on the right for the global rmsb between each frame, from low in black to high in red.



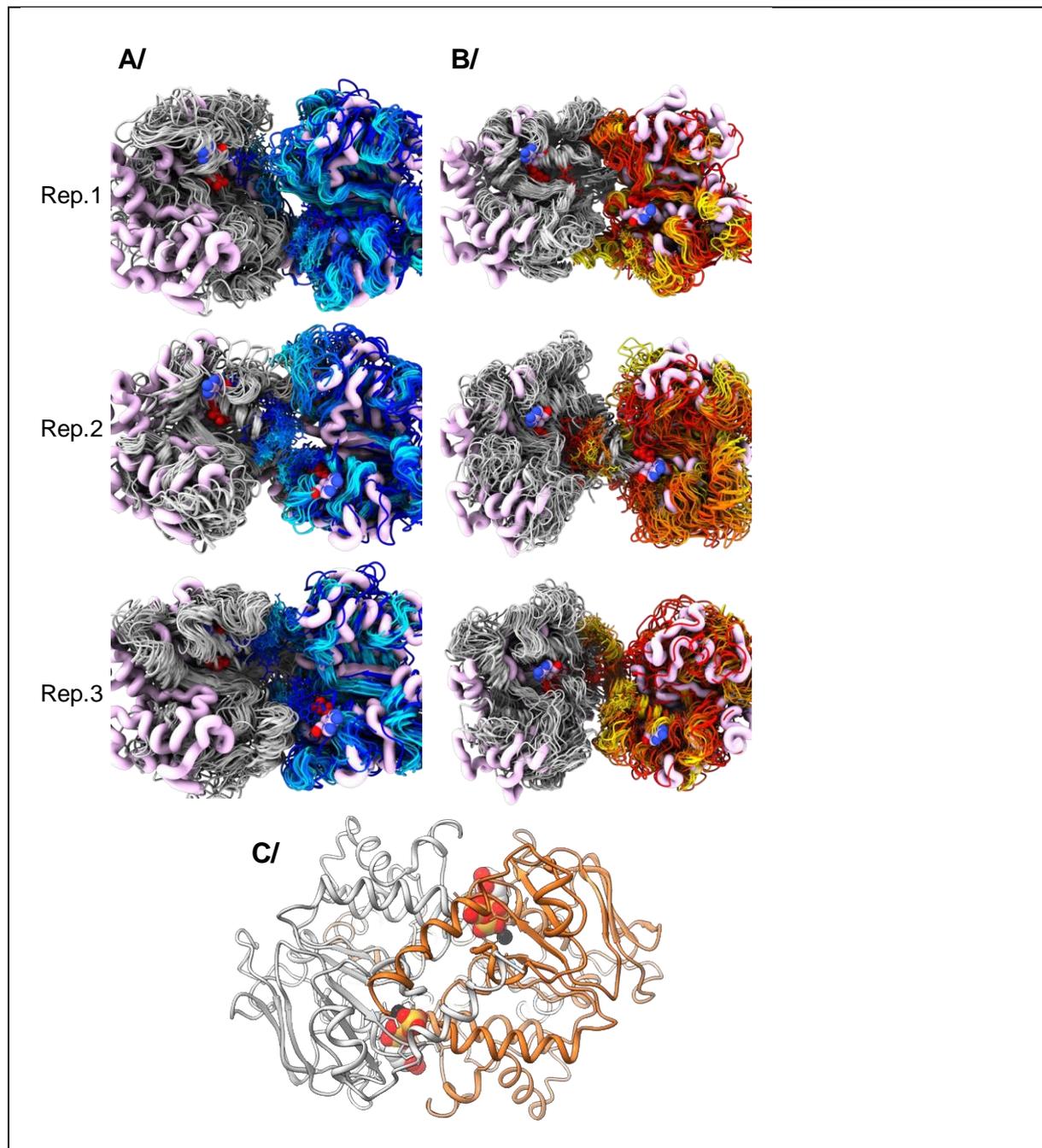
Supp-Figure 18: Visualization of protein movement during each MD simulation. **A/** E504A^{apo} was simulated in 3 independent replicas. The initial structure is shown as thick pink cartoon and a snapshot of the simulation is shown each 20 ns, colored from blue to cyan as the simulation progresses. **B/** Same as A/ but for BmrA^{R6G}, colored from red to yellow.



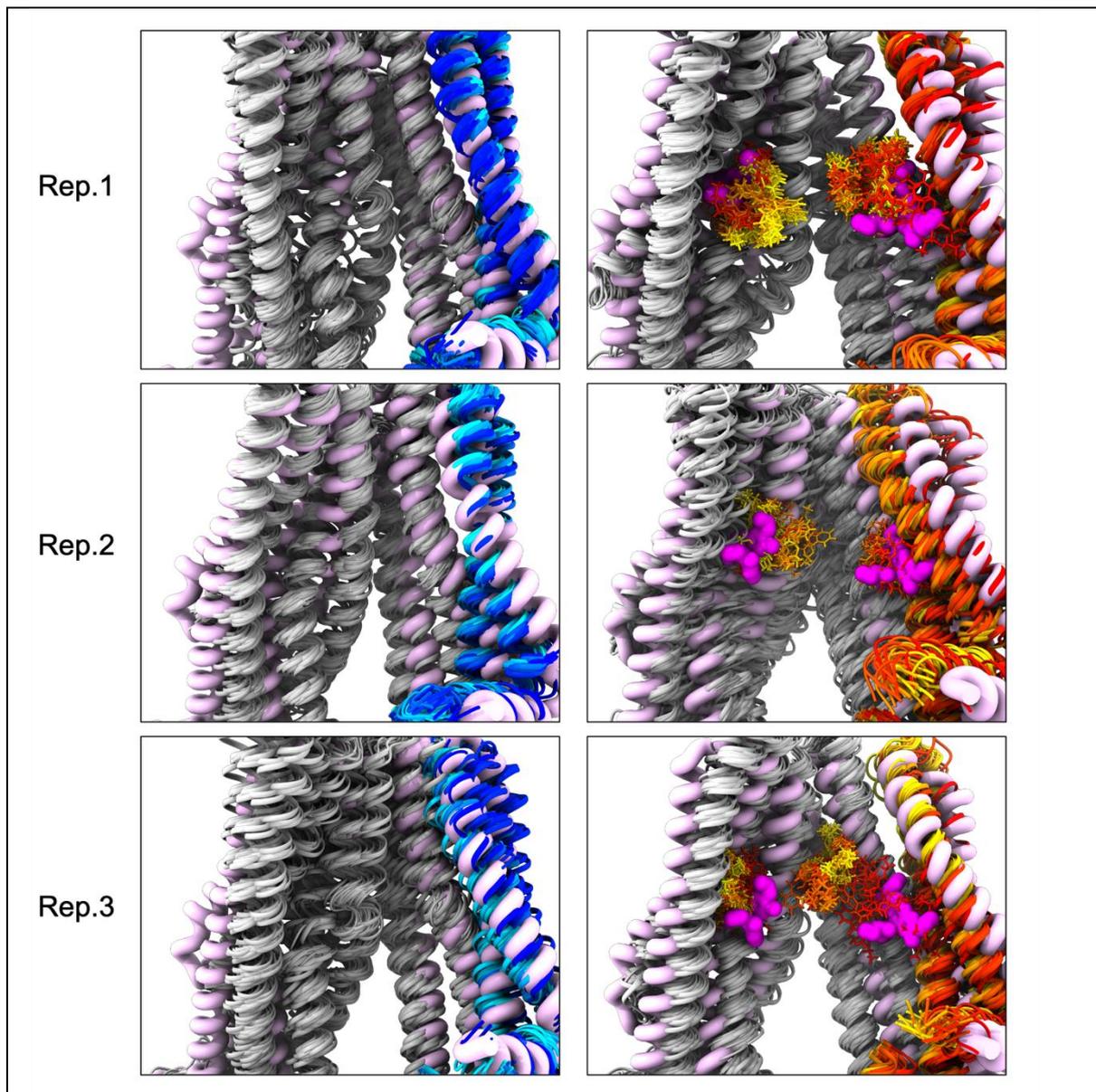
Supp-Figure 19: Visualization of protein movement during MD simulations. Same simulations as supp-Figure 16, with the arrow representing the distance between the initial and final frame of the simulation for E504A^{apo}. One monomer is colored in blue, the other in light grey **A/** Seen from the side, and **B/** seen from under. **C/** and **D/** are the same as A/ and B/ for E504A^{R6G}.



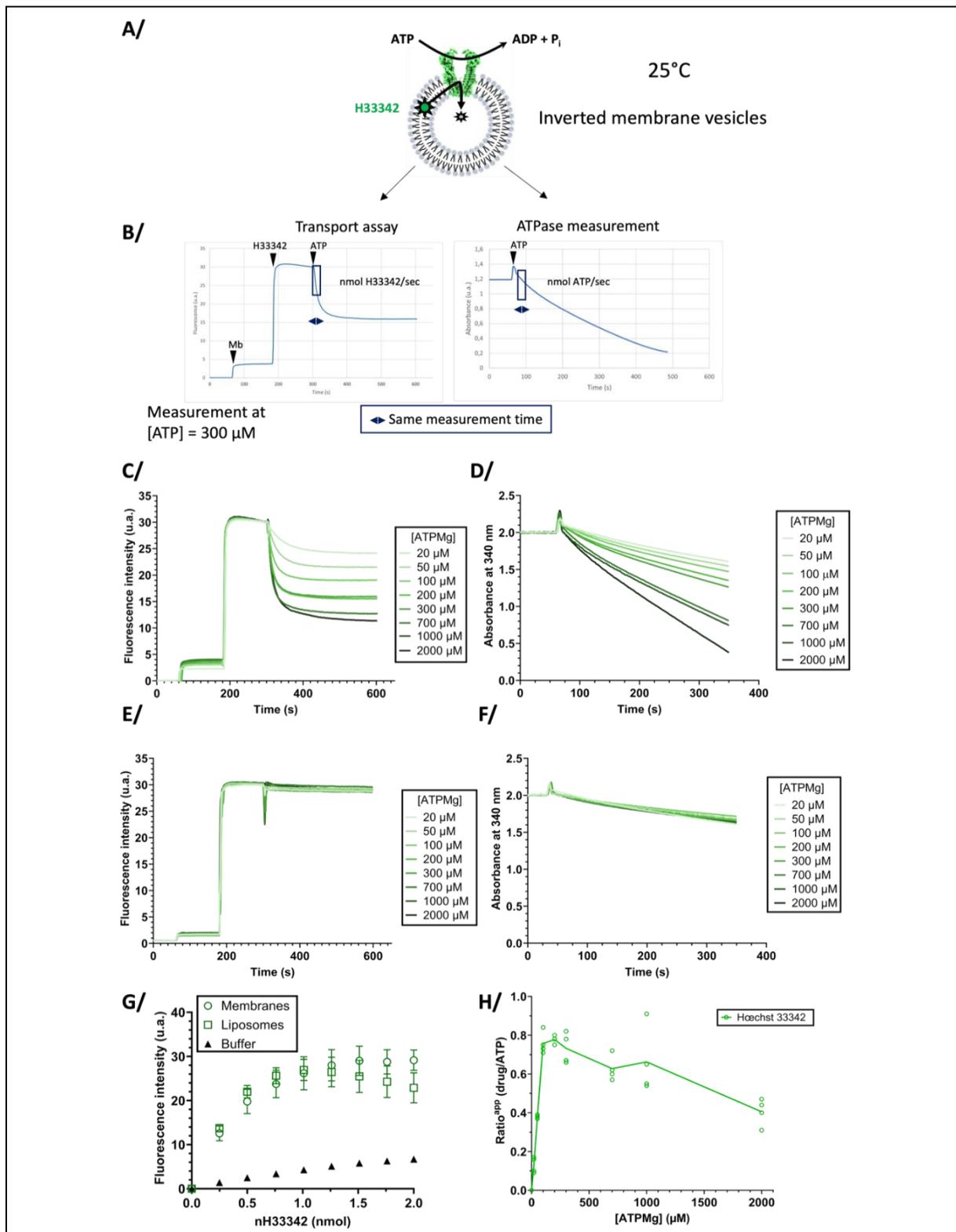
Supp-Figure 20: Residue displacement during MD simulations. For each protein E504A^{apo} or E504A^{R6G}, the sum of displacement by residue across the three dynamics is displayed as a function of time. Each frame is sampled every 2ns, for a total of 700ns for each simulation. The color scale on the right represents the amount of displacement in Å, from 0 (blue) to 80 Å (black). The top and bottom panels represent the two halves of the transporter.



Supp-Figure 21: NBD and ATP flexibility during MD simulations. **A/** BmrA^{apo}. **B/** BmrA^{R6G}. For each replicate, the initial structure is shown in thick pink cartoon and initial ATP-Mg²⁺ position in thick sticks colored by atom type. The simulation of 700ns has been divided in 35 snapshots separated at equal time during the simulation, and represented in cartoon for the protein and sticks for ATP-Mg²⁺. The colors for the simulation range from blue to cyan or red to yellow to match the observations by 3DVA. **C/** OF conformation of BmrA for reference (PDB 7bg4), one monomer in orange, the other silver, ATP in spheres colored by atom type, and Mg in black.

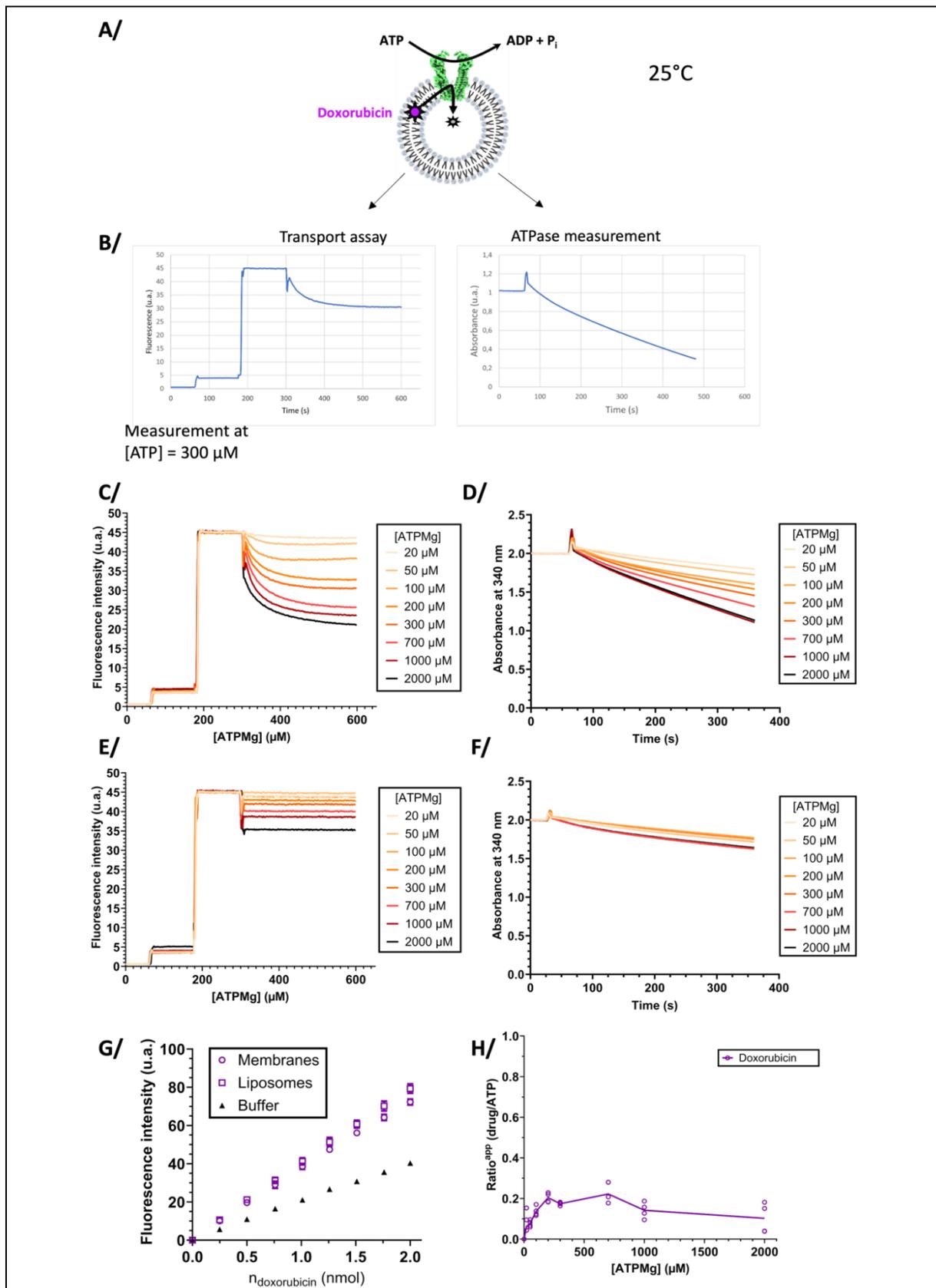


Supp-Figure 22: Mobility of R6G in its binding pocket. For each replicate of BmrA^{R6G}, the initial structure is shown in thick pink cartoon and initial R6G position in magenta thick sticks. The simulation of 700ns has been divided in 35 snapshots separated at equal time during the simulation, and represented in cartoon for the protein and sticks for R6G. The colors for the simulation range from red to yellow to match the observations by 3DVA. The 3 replicates were made. Left panel, no R6G was present.



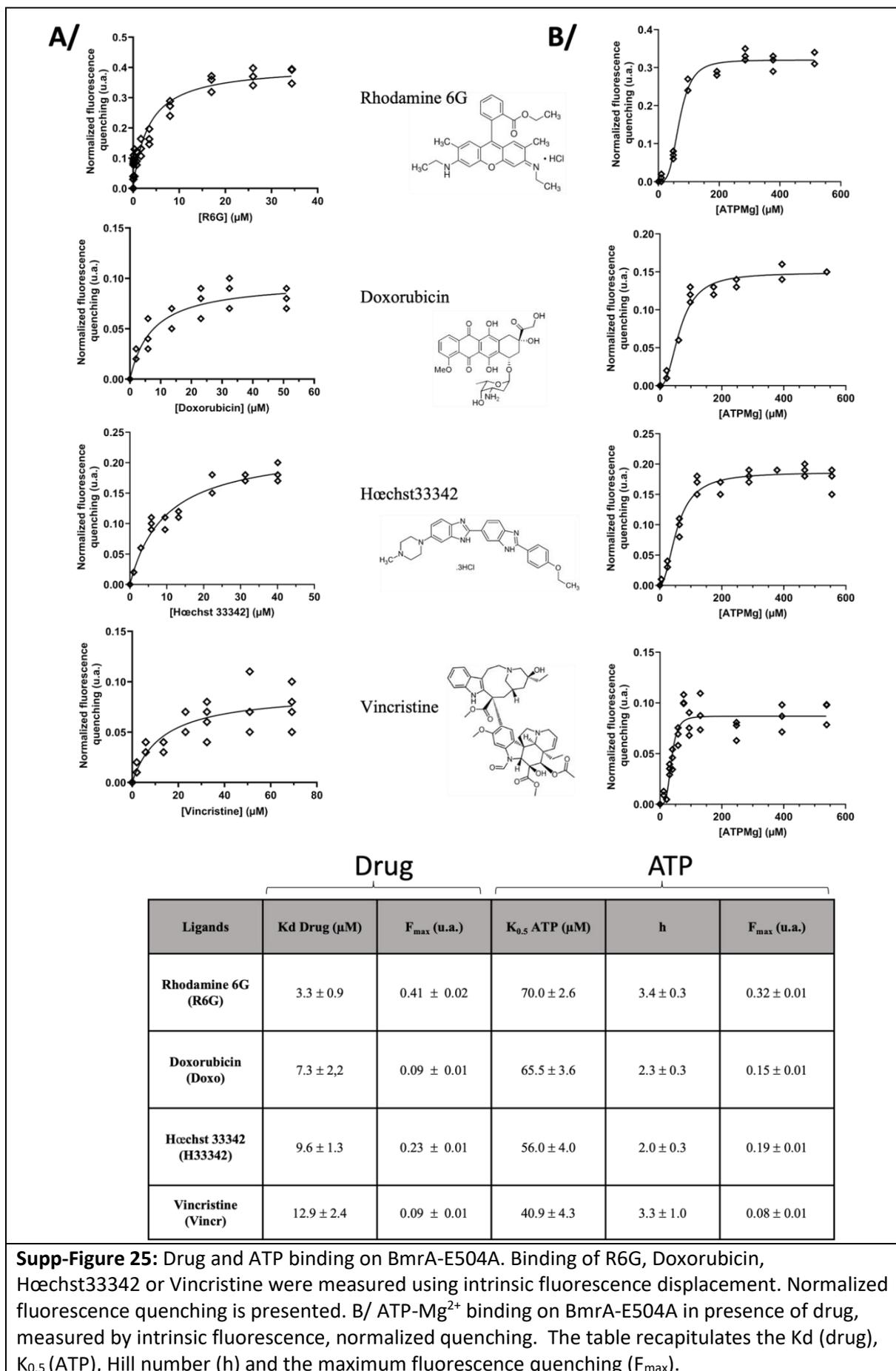
Supp-Figure 23: transport of H33342 and ATPase activity for BmrA WT. **A/** Schematic representation of the experiment. **B/** Representative traces of substrate transport (left) and ATPase activity (right) for BmrA WT performed on the same membrane vesicles, the same day. All experiments have been carried out in quadruplicates, from 2 different membrane batches. The time range of measurement for transport is shown as a black rectangle on each graph. **C/** One monoplicate of substrate transport for the whole range of ATP tested. **D/** corresponding ATPase activities on the same membranes. **E/ F/** same as C/ and D/ but for the inactive mutant E504A. contaminant activities measured with the mutant E504A were deduced to BmrA WT activities for

both transport and ATPase activities. **G/** Standard curve of Høchst33342 fluorescence increase as a function of Høchst33342 being added to a fixed amount of lipid, done on membranes (green circles), liposomes (green squares; liposome concentration chosen to have the same maximum as membranes) or in buffer (black diamond), for quantification of Høchst 33342 transport. **H/** Ratio of Høchst 33342 transported per ATP hydrolyzed, for each ATP concentration investigated.



Supp-Figure 24: Doxorubicin transport. **A/** Schematic representation of the experiment. **B/** Representative traces of substrate transport (left) and ATPase activity (right) for BmrA WT performed on the same membrane vesicles, the same day. All experiments have been carried out in quadruplicates, from 2 different membrane batches. The time range of measurement for

transport is shown as a black rectangle on each graph. **C/** One monoplicate of substrate transport for the whole range of ATP tested. **D/** corresponding ATPase activities on the same membranes. **E/ F/** same as C/ and D/ but for the inactive mutant E504A. contaminant activities measured with the mutant E504A were deduced to BmrA WT activities for both transport and ATPase activities. **G/** Standard curve of Doxorubicin fluorescence increase as a function of Doxorubicin being added to a fixed amount of lipid, done on membranes (green circles), liposomes (green squares, liposome concentration chosen to have the same maximum as membranes) or in buffer (black diamond), for quantification of Doxorubicin transport. **H/** Ratio of Doxorubicin transported per ATP hydrolyzed, for each ATP concentration investigated.



3.5 Publication 3 : “Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement”

BBA - Biomembranes 1865 (2023) 184133



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Biomembranes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem



Conformational space exploration of cryo-EM structures by variability refinement

Pavel V. Afonine^{a,*}, Alexia Gobet^b, Loïck Moissonnier^b, Juliette Martin^b, Billy K. Poon^a, Vincent Chaptal^{b,*}

^a Molecular Biosciences and Integrated Bioimaging, Lawrence Berkeley National Laboratory, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA

^b Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR5086 CNRS University Lyon1, 7 passage du Vercors, 69007 Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cryo-EM
Variability analysis
Structure modelling
Phenix.varref

ABSTRACT

Cryo-EM observation of biological samples enables visualization of sample heterogeneity, in the form of discrete states that are separable, or continuous heterogeneity as a result of local protein motion before flash freezing. Variability analysis of this continuous heterogeneity describes the variance between a particle stack and a volume, and results in a map series describing the various steps undertaken by the sample in the particle stack. While this observation is absolutely stunning, it is very hard to pinpoint structural details to elements of the maps. In order to bridge the gap between observation and explanation, we designed a tool that refines an ensemble of structures into all the maps from variability analysis. Using this bundle of structures, it is easy to spot variable parts of the structure, as well as the parts that are not moving. Comparison with molecular dynamics simulations highlights the fact that the movements follow the same directions, albeit with different amplitudes. Ligand can also be investigated using this method. Variability refinement is available in the *Phenix* software suite, accessible under the program name *phenix.varref*.

1. Introduction

Proteins can be very mobile. They are subject to thermal entropy, and thus to deformations. Most of them undergo structural changes in line with their activity to fulfill their function. These movements range from local displacements to large domains movements.

Up until recently, these protein motions were mostly out of reach of high-resolution structures. X-ray crystallography was the main contributor of structures, and is by definition trying to diminish movements within the crystal to reach high resolution. Nevertheless, it was still possible to observe parts of the structure where the maps were poorly defined, implying local motion. The computation of Translation Libration Screw (TLS) parameters [1,2] modeled large protein movements within the crystal which can be visualized as anisotropic displacement parameters. All in all, hints about protein motions could be deduced or calculated, but it was mostly linked to an absence of signal and always in the context of the crystal. Only solution NMR was able to capture protein dynamics, resulting in an ensemble of structure best fitting the distance restraints [3]. Unfortunately, this method is limited by the protein size, and solid-state NMR is still under development [4,5]

and cannot reach the large objects studied today.

Electron microscopy in cryogenic conditions (cryo-EM) made a real breakthrough in this regard by being able to visualize the sample under turnover conditions, and at high resolution [6,7]. Cryo-EM is thus able to separate multiple conformations in the same sample. One potential application is in the elucidation of the structural changes during a catalytic cycle which will shed light on complex mechanisms. In addition to these large conformational changes, it is also possible to further dissect local proteins motions [8–12]. This is done by analyzing the variance of particle stacks to a volume along principal components, and outputs a series of volumes depicting protein motions.

These readily available local deformations are a real breakthrough in our understanding of protein movement dynamics. Many proteins use an energy source to undergo structural conformation, and defining energetic barriers is crucial to the fine understanding of their molecular mechanisms. The comparison of the maps constituting the movement is already a great achievement, it is undoubtedly mesmerizing to observe the movements that were only conceptualized before. However, making sense of the motions requires detailed observation by a trained user, and it is hard to relate the motion to given parts of the protein.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: PAfonine@lbl.gov (P.V. Afonine), vincent.chaptal@ibcp.fr (V. Chaptal).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184133>

Received 23 December 2022; Received in revised form 27 January 2023; Accepted 28 January 2023

Available online 3 February 2023

0005-2736/© 2023 Published by Elsevier B.V. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).

In order to bridge the gap between observation and explanation, we designed a tool to create an ensemble of models fitting each map derived from variability analysis. The result is an ensemble of PDB models that can be used to describe protein movements, highlight transiently disordered parts of the structure, local rearrangements, helical twists and more. This ensemble of structures is complementary to high resolution structures, describes local motion and can serve as a base to more detailed dynamic studies. This tool has been made available in the Phenix software package [13] under the name *phenix.varref* and referred to as “variability refinement”.

2. Results

2.1. Generation of an ensemble of structures from a series of maps

Sample heterogeneity is observed in cryo-EM by fast freezing a sample under certain conditions, allowing local vibrations or larger structural changes to be preserved (Fig. 1A). To reach high resolution, *in-silico* purification of a set of particles is required, yielding a high-resolution map (Fig. 1B). This set of particles used to create the map still contains a certain level of heterogeneity (Fig. 1C) that variability analysis can extract and output as a map series (Fig. 1D), where each map differs a bit from each other relating a movement along a principal component axis [8].

In order to best describe these motions on the atomic level, a tool was created to create an ensemble of models, each model fitting its own map, given a high-resolution model. The procedure begins with pair-wise comparison of maps using correlation coefficient CC_{box} [14] to sort and order maps by similarity (e.g., map i and map $i + 1$ are more similar than map i and map $i + 2$, and so on; map 1 and map M are most dissimilar; $i = 1, \dots, M$, M is the number of maps). Then the best matching map to the given starting atomic model is identified using map-model correlation coefficient CC_{mask} [14]. This map is used to perform the

first series of refinements. Each series of refinements against given map consists of N ($N \sim 10\text{--}100$) refinements with identical settings but slightly perturbed input model. Performing the series of refinements rather than a single refinement is rationalized and illustrated in Section 3.2.4 in [15]. In a nutshell, this is done because refinement is a local optimization problem that has rather small convergence radius and is prone to be trapped in a nearest local minimum of the goal function being optimized. Starting with an ensemble of perturbed models allows for better sampling of the conformational space as well as for estimating an uncertainty in atomic positions [16]. The series of refinements against each map yields an ensemble of N refined models as well as the overall best model selected based in the CC_{mask} . Next, the series N refinements proceeds with the following closest map and N refined models from the previous refinement as the starting point. In the end, the procedure generates $N \times M$ refined models and M overall best refined models.

2.2. Application of variability refinement to flexibility of the ABC transporter BmrA in the outward-facing conformation

ABC transporters are integral membrane proteins that harness the energy of ATP binding and hydrolysis to translocate substrates across biological membranes [18,19]. BmrA is a multi-drug transporter from *B. subtilis*, that protects this microorganism in the competition for the biotope against *Streptomyces tendae*, which secretes cervimycin C as a biological weapon [20–22]. BmrA expels drugs out of the cell, thereby decreasing their concentration below cytotoxic levels, and thus protects the organism against xenobiotics. More generally, this mode of protection is found in every kingdom of life, and is a major mechanism leading to resistance to cancer treatments [23,24], anti-fungal treatments [25–27] as well as antibiotic treatments [28,29]. It is also found in all the physiological barriers in humans [30–32], having a key role in drug bio-availabilities throughout the organism.

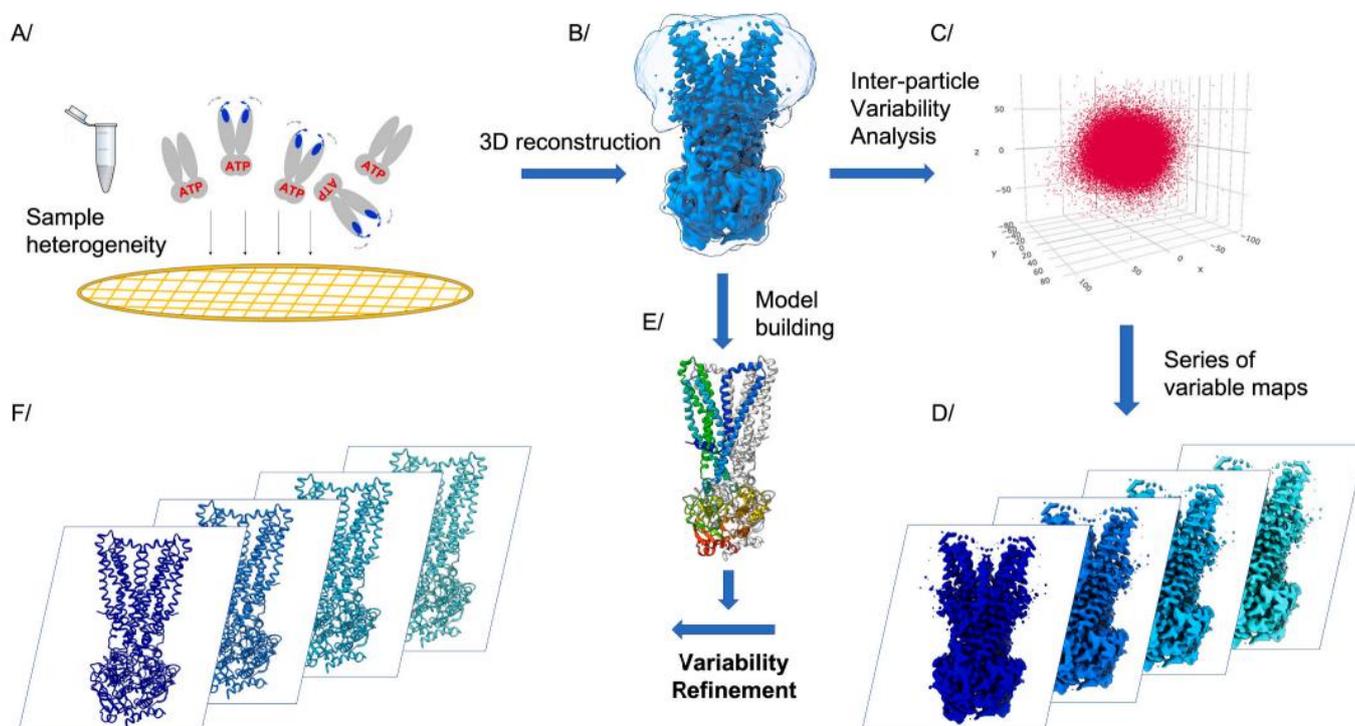


Fig. 1. Schematic description of variability refinement. A/ Sample heterogeneity is observed in cryo-EM by applying a sample on the grid and freezing its multiple states in liquid ethane. B/ 3D reconstruction from a set of particles yields an electrostatic potential map. C/ The 3D reconstruction is originating from a set of particles that differ more or less to the consensus. Variability can be observed using several software, here it is represented using 3DVA in CryoSPARC [17], where particles are separated by principal components axis. D/ From the variability analysis, a series of map is output. E/ A consensus model is built from the consensus map in B/. From the consensus model and the map series derived from 3DVA, variability refinement builds a model in each map to grasp the local movements.

The recent structure of BmrA in the outward-facing conformation, with and without substrate, in a pre-release state brought new insights to how the protein functions and to its energy landscape [33]. For instance, it was shown that no energy from ATP hydrolysis was needed to change the conformation from the inward-facing state to the outward-facing one, and that following substrate-release the transporter closes immediately to an occluded state. Plasticity and hydrophobic collapse were identified as the main drivers to a newly postulated swing mechanism of transport, allowing BmrA to handle a large variety of structurally unrelated drugs, a hallmark of multidrug transporter.

This outward-facing conformation is thought to be stable. Nevertheless, BmrA still undergoes local deformations that can be captured in the cryo-EM particle stack. 3D variability analysis of the high-resolution reconstruction shows movement of BmrA, reminiscent of how the transporter fluctuates around a central position (Fig. 2A, B). Ensemble refinement in all the maps provided by 3DVA notably highlights the flexibility of the loop between TM1–2 (Fig. 2C), which has been identified to be key in the protein's adaptation to drugs [33]. The flexibility of this loop is detectable in the consensus map by judging the low contour of the density. This is due to the protein's flexibility in this region which makes the loop hard to model. Ensemble refinement captures the flexibility, highlighted by variability analysis, of this zone.

2.3. Comparison of movements between variability refinement and molecular dynamics simulations

All-atom molecular dynamics (MD) simulation of BmrA in a phospholipid bilayer has been performed in the same conditions as the structure [33], thus allowing the comparison of the observed movements (Fig. 3A–D). The first observation is that the magnitude of the movements is a bit larger in the MD simulation compared to the variability contained within the particle stack used to recreate the volume at high resolution, which is in accordance with the expectation that restrained coordinates are required to reach high resolution (cryo-EM map) compared to giving freedom to the system to explore conformational space (MD simulation). Upon closer look, it becomes clear that the movements revealed by variability refinement correspond to the same ones observed by MD simulation, also exemplified by a comparison of moving parts of the structure using a rmsf (Fig. 3E). The larger movements of the TM1–2 loop, as well as the TM3–4 and TM5–6 linkers, are clearly distinguishable in the bundle of structures and correspond to the most variable regions of the transporter in this conformation.

In the nucleotide-binding domain (NBD), the vibration observed in MD simulations is also transcribed in the bundle of structures created by variability refinement, even though it is clear that this region is moving less than the trans-membrane region. Ligand movement is also seen, and detailed below.

Overall, the structure bundle is revealing the regions of the protein undergoing structural rearrangements. Even though the movement amplitude is a bit less in this particle stack compared to the MD simulation, it is striking to notice that the movements described for the protein are in the same direction for each secondary structure element. The structure bundle created by variability refinement grants this visualization, as a first approximation to larger protein movements. It is for example interesting to measure a vertical vibration of TM1 of 4.5 Å along the helix in the variability refinement bundle, compared to 6 Å for the MD simulation in the same direction. The loop between TM1–2 is however not following the same direction of deformation, and thus the beginning of TM2 neither. It is important to remember that the movement seen via variability analysis is a principal component analysis and thus reporting a main direction of movement. Comparison with the other principal components of the movement is thus important to establish the whole movement. This should be undertaken in the detailed molecular analysis, and many tools are available to analyze structure bundles in various software packages.

2.4. Movements of ligands

Ligands are also handled by variability refinement. Note that an important strategy for variability analysis is the calculation at lower resolution than the one used to obtain the highest resolution map since protein deformations are more likely to be seen at lower resolution. Thus, ligands density can become less clear or become lost, so caution is advertised to interpret ligand movements using this method. If needed, restraints can be provided to link the ligand to the protein so it can ride along with the deformations. This can be the case for ions for instance, while larger ligands will be less subjected to density loss for the entire length of the ligand. In the structure of BmrA, ATP has a well-defined density in the consensus map, and while density is still visible in the 3DVA analysis, its quality is affected by the lower resolution of the calculation. Thus, it is important to add distance restraints otherwise the harsh procedure to escape local energy minimum will trigger the protein loops to move into ligand density, leading to over-refined structures, and doubtful results. Comparison of ATP in the MD simulation with the structure bundle coming from variability refinement (Fig. 4A) gives hints on the movements undergone by the ligand within the structure. Fig. 4A highlights that ATP can undergo significant movements in the outward-facing conformation, in the two types of studies. Molecular details shown in Fig. 4B–D follow the movements observed for the whole transporter (Fig. 3), where the amplitude of movements is larger in the MD simulation. Overall, this allows visualizing how the ligand move in concert with the protein, and follows protein movements. Variability analysis and refinement thus helps to understand local movements within the structure.

2.5. Application of phenix.varref to large complexes

Variability refinement was tested on a large super-complex to assess the robustness of the software. CryoEM maps derived from variability analysis of EMPIAR-10180 entry were graciously shared by the CryoSPARC team for this analysis. This structure of the pre-catalytic yeast spliceosome [34] contains 39 protein chains and 5 nucleic acid chains, for a total of 2.5 MDa. Variability refinement successfully modeled each chain in the map, faithfully following the movement observed in cryoEM maps (Fig. 5A, B). Each chain undergoes different movement according to the deformation observed in the cryoEM structure, allowing for investigators to observe protein movements within the structure. In addition to being a large complex, this structure is also of modest resolution (7 Å overall), making that variability analysis was calculated at 8 Å resolution. There is thus a lack of details to guide the exact reconstruction of the super-complex, and this is especially notable in some regions of the complex like exemplified on the top-right part of the structure (Fig. 5A), for which electron maps show the least quality, synonym of maximum displacement. The placement of a model in this context is a major challenge, and care is advertised in the interpretation of movements in this region. Undeniably, a higher resolution version of this structure will render reconstructions more accurate, and a better description of movements going on in this region of the complex.

3. Discussion/conclusion

An interesting feature of cryo-EM is the ability to observe a sample in multiple states. These states can represent the variability inherent in the sample and various methods exist to analyze the variability between a volume and a set of particles. The result is a map series that recreates a movement. While this movement is a wonderful way to visualize how a protein deforms around a given conformation, it is hard to dissect the movement and pinpoint local deformations on a map. We created the tool *variability refinement* to refine an ensemble of structures for each map originating from variability analysis, thus creating a bundle of structures that describes the movement. It is then easy to spot the variable parts of the protein, and to define the amino-acids involved in the

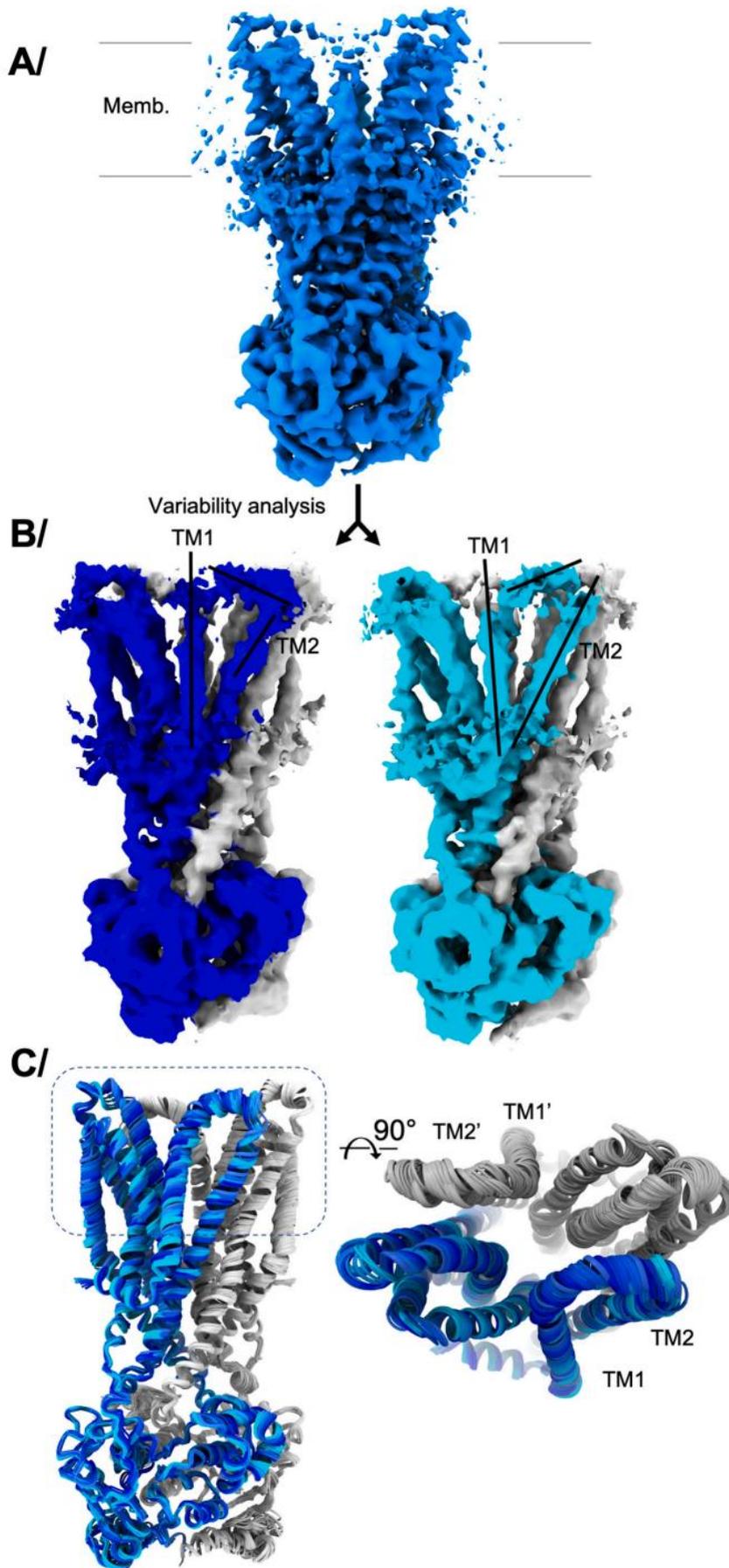


Fig. 2. 3D variability analysis of the ABC transporter BmrA in the outward-facing conformation. A/ Consensus reconstruction shown perpendicular to the membrane plane. B/ Variability analysis with the two outmost maps displayed. One monomer shown in blue and the other in silver. Movements range from dark blue to cyan. Different positions of TM1, TM2 and the loop between the two are displayed with black bars. C/ Variability refinement of BmrA in all the maps originating from variability analysis. The protein is shown in cartoon, with one monomer in silver and the other in blue, with a color gradient ranging from dark blue to cyan according to B/. 20 models are displayed to visualize all the positions sampled by the protein. The overall rmsd is 0.6 Å/1065 residues (dimer), with local displacements in TM1-2 and other flexible regions of 2 Å per residue.

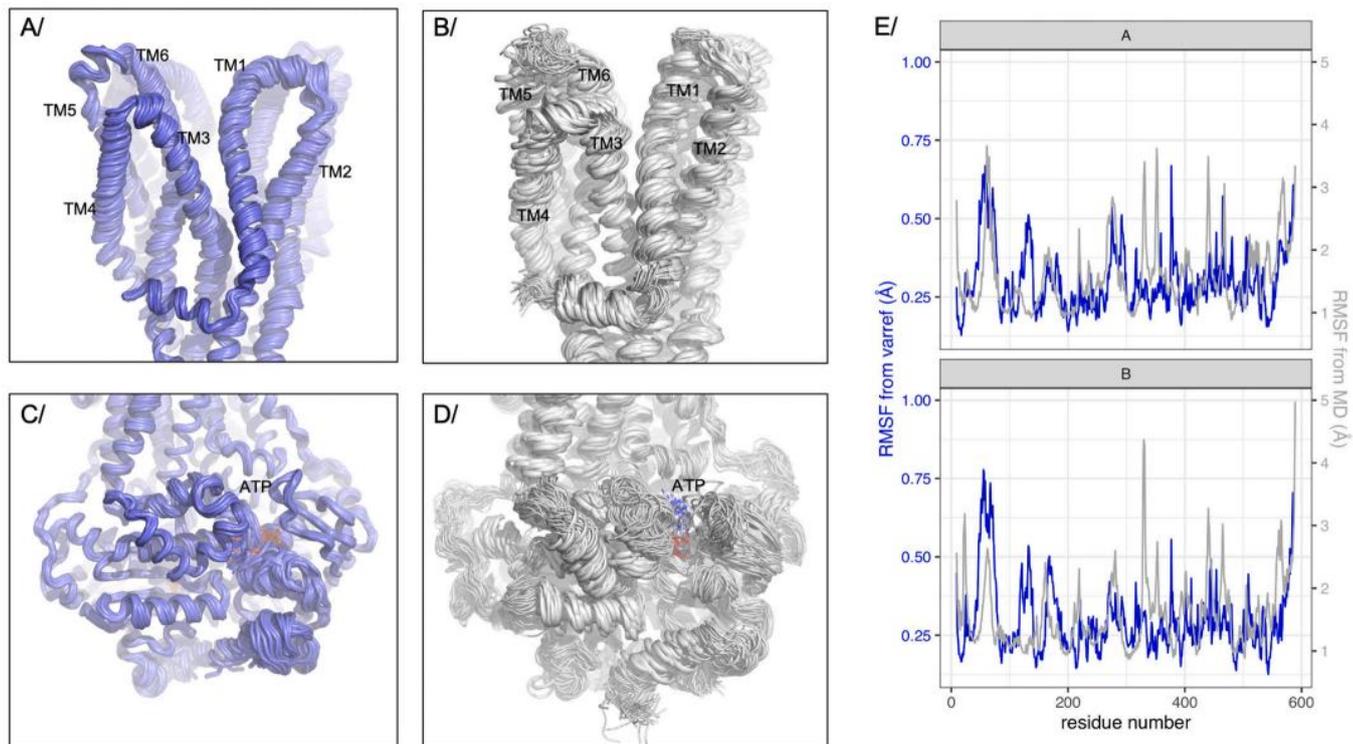


Fig. 3. Comparison of variable parts of the structure compared to molecular dynamics simulation. Panel A/ and C/ show the movement derived from variability refinement, while B and D show movements undergone during molecular dynamics simulation. The movement is separated for trans membrane domain on top with trans-membrane helices labeled, and the nucleotide binding domain at the bottom with ATP labeled. Protein shown in cartoon and ATP in sticks colored by atom type. In the MD simulation, the rmsd between models varies between 1.6 and 2.7 Å for 590 residues (monomer). E/ Overlay of rmsf calculated for the variability refinement bundle (blue) or molecular dynamics simulation (grey) for both chains.

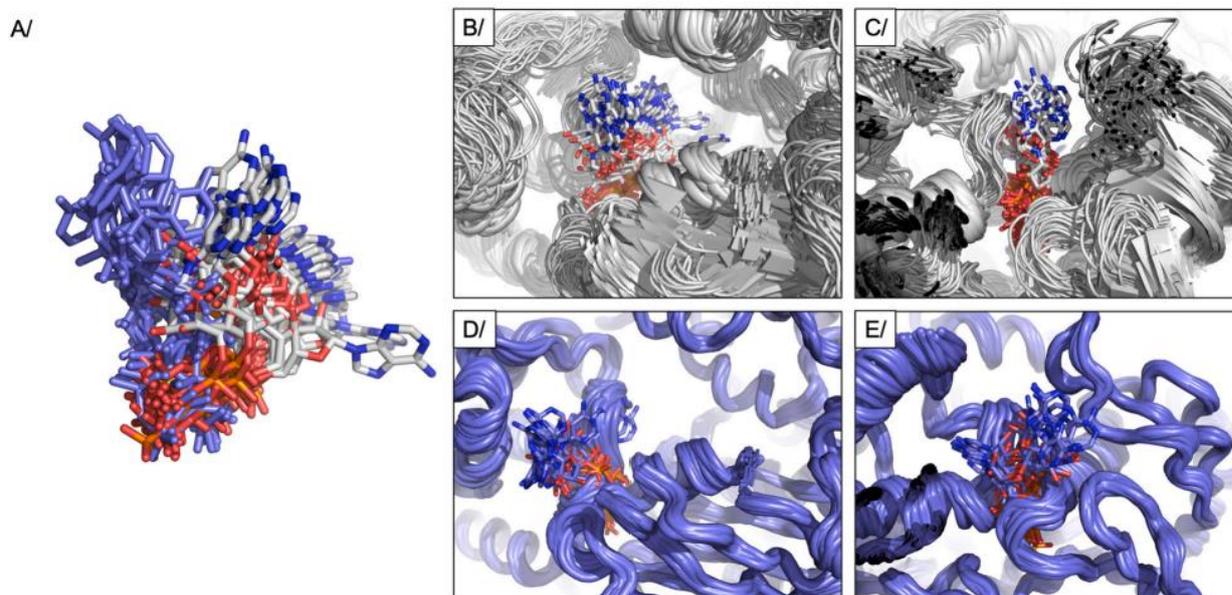


Fig. 4. Comparison of ATP movement using variability refinement and molecular dynamics simulations, in the same conditions. A/ ATP overlay between molecular dynamics simulations (colored by atom type) and variability refinement (blue). B/ and C/ show 2 views of the ATP-binding site from molecular dynamics simulations. C/ and D/ show the same views for the ATP binding-site from variability refinement.

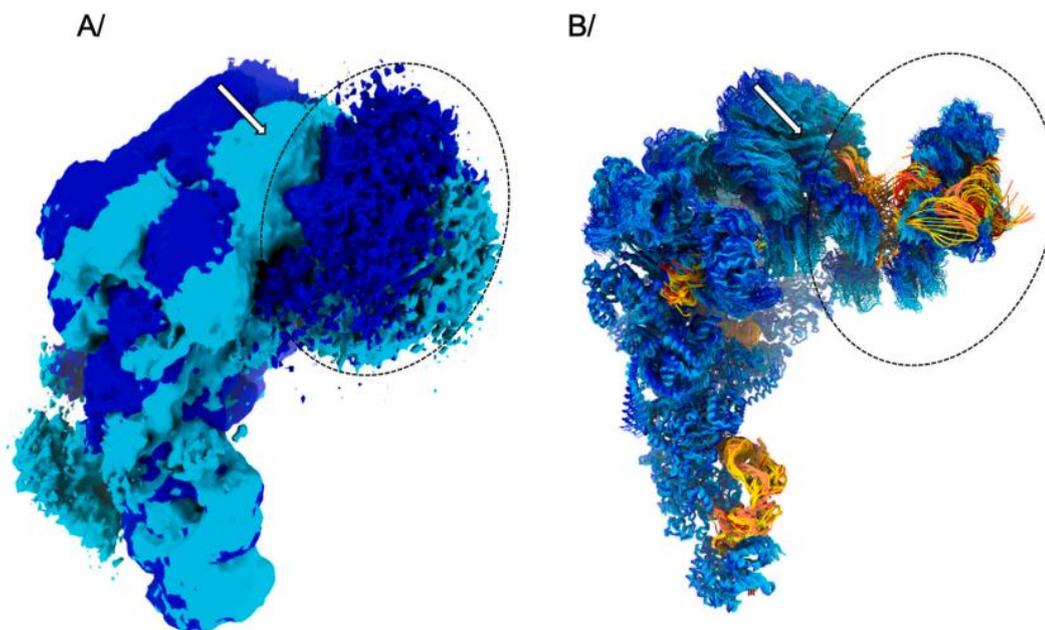


Fig. 5. Variability refinement of the spliceosome (EMPIAR-10180). A/ Variability analysis of EMPIAR-10180 calculated by CryoSPARC, with the two outmost maps displayed; movements range from dark blue to cyan. B/ Variability refinement of the spliceosome, with protein chains colored from dark blue to cyan (following the maps coloring), and DNA chains from red to yellow. The white arrow exemplifies a movement as seen in the cryoEM maps (A/), and its calculation using variability refinement (B/). The dashed circle points to an area where the signal is very low and thus the model generated has to be interpreted with caution.

movement and those that are not. Investigators can have access to key deformation hot spots, and measure and quantify the movements using standard PDB tools that are widely available.

It would be interesting to add time to the structural changes observed. Admittedly, the movement output by variability analysis is a principal component analysis of particle variability, and the linearity of the movement is originating from computation [8]. Nevertheless, the ensemble of maps, and now of structures, depicts protein variability in this experimental condition, and in this regard, the movie of the protein moving along the principal component represents a plausible event. By combining movements along several principal components, a comprehensive view of the movement can be grasped. Therefore, considering the set of maps as a trajectory is a believable proxy. Comparison with MD simulations reveals that the direction of the movements observed for the ABC transporter BmrA in the outward-facing conformation are the same, and that the flexible regions correspond between MD simulation and variability analysis. The movement amplitude is however smaller in this variability analysis, revealing that the time that the protein would use to undergo these conformational changes is smaller than the MD simulation time, of 500 ns in this case. Nevertheless, it is interesting to note that the movements described by both methods follow the same directions, giving hints to the deformable parts within the structure.

The variability analysis of BmrA in this outward-facing conformation is in the small range, corresponding to local displacements. BmrA also undergoes significantly larger movements in the inward-facing conformation, currently being investigated and tested for variability refinement but not shown here as the analysis is still preliminary. We also showed that variability refinement can be used for even larger systems like the spliceosome [34] that undergo much larger structural changes with movements of large domains, and it will be interesting to test it for other similar systems [35,36]. The *variability refinement* tool is publicly available in Phenix starting with the version dev-4799 for investigators to use.

Now that Artificial Intelligence (AI) has undergone a major leap in deciphering the code to predict protein structures from sequence [37], the next step is to know how these proteins move. Using variability refinement, the community has now a method to create a new type of

learning set for AI to predict protein movements, and steps will be undertaken to make this data publicly available. Along the same lines, the very recent release of another type of movement descriptor by 3DFLEX [38] allows for a whole visualization of the movement, not limited to linear interpretation, and reflecting conformational flexibility. Steps are being undertaken to adapt variability refinement to this new calculation of protein flexibility.

4. Material and methods

4.1. Generation of the map ensemble for the ABC transporter BmrA

3D variability analysis for BmrA is performed in CryoSPARC v3.3. 3D variability analysis was carried on 327,764 particles used for the consensus high-resolution reconstruction [33] (PDB: 7OW8. EMDB: 13095). Variability was computed in simple mode, at 6 Å resolution and C1 symmetry.

4.2. Variability refinement of BmrA

Maps originating from 3DVA were input to *phenix.varref* along with the refined structure and a resolution of 6 Å, on a 72-core Linux calculation server (Intel® Xeon® 6240 at 2.60 GHz). Using 50 cores, the job ran in about 6 h. Some distance restraints were used between ATP atoms and some residues in the neighboring loops.

4.3. Variability refinement of the spliceosome

Maps originating from 3DVA were generously shared by the cryoSPARC team, performed on EMPIAR entry 10180. Only the component 0 was used to assess the feasibility of using *phenix.varref* on such a large super-complex. 3DVA was calculated by the cryoSPARC team using the particles and mask from the EMPIAR entry, using a filter resolution of 8 Å. Finally, maps were displayed with a filter resolution of 6 Å. Using 50 cores (on an Intel® Xeon® 6240 at 2.60 GHz), the job ran in about 6 days.

4.4. Usage of phenix.varref

Variability refinement in phenix can be launched using the command-line:

```
phenix.varref name.pdb frame_*.mrc resolution=4 nproc=50
models_per_map=50
```

where name.pdb is the refined model, frame_*.mrc points to the maps from variability refinement, the resolution needs to be specified, nproc is the number of processors, and models_per_map indicate the initial number of models created, 50 by default.

Figures were created with ChimeraX [39] and Pymol [40].

CRedit authorship contribution statement

VC initiated the study. PVA and BKP wrote the software. AG, LM and VC tested the program on their 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, and the French National Research Agency grant number ANR-19-CE11-0023-01 to VC and AG. VC wishes to thank Xavier Robert for his help running the crystallography calculation cluster. PVA and BKP thanks the NIH (grants R01GM071939, P01GM063210 and R24GM141254) and the PHENIX Industrial Consortium for support of the PHENIX project, as well as the support by the U.S. Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231. The authors thank the cryoSPARC team for sharing the spliceosome 3DVA maps.

References

- [1] A. Urzhumtsev, P.V. Afonine, P.D. Adams, TLS from fundamentals to practice, *Crystallogr. Rev.* 19 (4) (2013) 230–270.
- [2] J. Painter, E.A. Merritt, TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models, *J. Appl. Crystallogr.* 39 (1) (2006) 109–111.
- [3] J. Kragelj, M. Blackledge, M.R. Jensen, Ensemble calculation for intrinsically disordered proteins using NMR parameters, *Adv. Exp. Med. Biol.* 870 (2015) 123–147.
- [4] V. Ladizhansky, Applications of solid-state NMR to membrane proteins, *Biochimica et biophysica acta (BBA) -Proteins and Proteomics* 1865 (11, Part B) (2017) 1577–1586.
- [5] L. Lecoq, et al., Solid-state NMR for studying the structure and dynamics of viral assemblies, *Viruses* 12 (10) (2020).
- [6] Q. Yu, et al., Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism, *Nat. Commun.* 12 (1) (2021) 4376.
- [7] S. Hofmann, et al., Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions, *Nature* 571 (7766) (2019) 580–583.
- [8] A. Punjani, D.J. Fleet, 3D variability analysis: resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM, *J. Struct. Biol.* 213 (2) (2021), 107702.
- [9] S.J. Ludtke, Chapter seven - single-particle refinement and variability analysis in EMAN2.1, in: R.A. Crowther (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2016, pp. 159–189.
- [10] J. Marino, G.F.X. Schertler, A set of common movements within GPCR-G-protein complexes from variability analysis of cryo-EM datasets, *J. Struct. Biol.* 213 (2) (2021), 107699.
- [11] E.D. Zhong, et al., CryoDRGN: reconstruction of heterogeneous cryo-EM structures using neural networks, *Nat. Methods* 18 (2) (2021) 176–185.
- [12] T. Nakane, et al., Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION, *eLife* 7 (2018), e36861.
- [13] P.D. Adams, et al., The phenix software for automated determination of macromolecular structures, *Methods* 55 (1) (2011) 94–106.
- [14] P.V. Afonine, et al., New tools for the analysis and validation of cryo-EM maps and atomic models, *Acta Crystallogr. Sect. D* 74 (9) (2018) 814–840.
- [15] P.V. Afonine, et al., Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D* 74 (6) (2018) 531–544.
- [16] T.C. Terwilliger, et al., Interpretation of ensembles created by multiple iterative rebuilding of macromolecular models, *Acta Crystallogr. Sect. D* 63 (5) (2007) 597–610.
- [17] A. Punjani, et al., cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination, *Nat. Methods* 14 (3) (2017) 290–296.
- [18] N. Khunweeraphong, K. Kuchler, Multidrug resistance in mammals and Fungi—From MDR to PDR: a rocky road from atomic structures to transport mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (9) (2021) 4806.
- [19] C. Thomas, R. Tampé, Structural and mechanistic principles of ABC transporters, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 605–636.
- [20] H. Krugel, et al., 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 (2) (2010) 155–163.
- [21] C. Orelle, et al., Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter *BmrA*, *Biochemistry* 47 (8) (2008) 2404–2412.
- [22] E. Steinfelds, et al., Characterization of YvcC (*BmrA*), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* 43 (23) (2004) 7491–7502.
- [23] J. He, et al., Pleiotropic roles of ABC transporters in breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (6) (2021).
- [24] W. Muriithi, et al., ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance, *Cancer Biol Med* 17 (2) (2020) 253–269.
- [25] A. Bueid, et al., Azole antifungal resistance in *aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (10) (2010) 2116–2118.
- [26] A. Lupetti, et al., Molecular basis of resistance to azole antifungals, *Trends Mol. Med.* 8 (2) (2002) 76–81.
- [27] S.G. Whaley, et al., Relative contribution of the ABC transporters *Cdr1*, *Pdh1*, and *Snq2* to azole resistance in *Candida glabrata*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (10) (2018), e01070-18.
- [28] A.M. Schmalstieg, et al., The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (9) (2012) 4806–4815.
- [29] H. Nikaido, Multidrug resistance in bacteria, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 119–146.
- [30] A.A. Joshi, et al., Placental ABC transporters: biological impact and pharmaceutical significance, *Pharm. Res.* 33 (12) (2016) 2847–2878.
- [31] C. Chaves, et al., Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration, *Curr. Pharm. Des.* 20 (10) (2014) 1450–1462.
- [32] G. Szakacs, et al., Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (3) (2006) 219–234.
- [33] V. Chaptal, et al., Substrate-bound and substrate-free outward-facing structures of a multidrug ABC exporter, *Sci. Adv.* 8 (4) (2022), eabg9215.
- [34] C. Plaschka, P.-C. Lin, K. Nagai, Structure of a pre-catalytic spliceosome, *Nature* 546 (7660) (2017) 617–621.
- [35] M.G. Campbell, et al., 2.8 Å resolution reconstruction of the thermoplasma acidophilum 20S proteasome using cryo-electron microscopy, *eLife* 4 (2015), e06380.
- [36] J.H. Davis, et al., Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit, *Cell* 167 (6) (2016) 1610–1622, e15.
- [37] J. Jumper, et al., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* 596 (7873) (2021) 583–589.
- [38] A. Punjani, D.J. Fleet, 3D Flexible Refinement: Structure and Motion of Flexible Proteins from Cryo-EM, *bioRxiv*, 2021.
- [39] E.F. Pettersen, et al., UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers, *Protein Sci.* 30 (1) (2021) 70–82.
- [40] PyMOL n.d. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

4 Partie 2 : Etude mécanistique de BmrA en temps résolu

La première partie du manuscrit a été consacrée à l'analyse des structures 3D statiques et l'analyse biochimique de BmrA ce qui a permis de mettre en évidence la relation entre les structures obtenues et la fonction de cette protéine. De plus, l'analyse de la variabilité a permis de faire un premier pas vers l'étude expérimentale des mouvements au sein de BmrA, et de commencer à comprendre son caractère dynamique, autrement dit sa « personnalité » (Henzler-Wildman et Kern 2007).

Cette partie du manuscrit sera consacrée à l'étude des différents aspects cinétiques et structuraux, permettant de cerner la « personnalité » de BmrA en jouant sur le temps.

4.1 L'échelle de temps au sein des protéines

Les protéines sont par nature des entités dynamiques, au contact de divers signaux chimiques ou physiques présent dans leur environnement proche. Cette dynamique peut être définie par l'amplitude et la direction des fluctuations des coordonnées atomiques dans la structure, se déroulant à différentes échelles de temps (Henzler-Wildman et Kern 2007; Lewandowski et al. 2015). Ces changements peuvent être de nature réversible ou irréversible (K. Nam et Wolf-Watz 2023). Au sein des protéines, il est possible de distinguer 3 types de mouvements propres à leur dynamique selon une échelle temporelle (Figure 26) (Haran et Riven 2023; Tousignant et Pelletier 2004).

Le premier type de mouvement concerne la flexibilité locale caractérisée par la vibration des atomes, et la rotation des chaînes latérales des acides aminés (rotamères). L'échelle de temps de ces événements est comprise entre la femtoseconde (10^{-15} s) à la picoseconde (10^{-12} s). Ces mouvements internes sont issus de la chimie des différents atomes composant la molécule, ou dû à des transferts d'énergie. Par exemple, les résidus du site actif d'une enzyme vont subir des réarrangements pour coordonner le substrat dans la meilleure disposition pour faciliter l'acte catalytique. La réaction chimique va engendrer des vibrations rapides des atomes pour former ou briser des liaisons pendant l'état de transition (Schramm et Schwartz 2018).

Ensuite, le deuxième type de mouvement est plus lent que le précédent, compris entre la nanoseconde (10^{-9} s) et la microseconde (10^{-6} s). Ce sont surtout des mouvements des structures secondaires comme les boucles et les hélices, et certaines structures tertiaires. Ces échelles de temps correspondent bien à la diffusion de molécules au sein des protéines. Le transfert de molécules d'eau de l'aquaporine Z est permis par des mouvements collectifs des hélices α transmembranaires entre la nanoseconde et la microseconde, d'après les données obtenus par RMN du solide et des simulations de dynamique moléculaire (Tan et al. 2024).

Enfin, le dernier type de mouvement correspond à des mouvements de plus grande amplitude, et des mouvements collectifs entre des sous-unités ou domaines de la protéine. Ceci se réalise entre la microseconde jusqu'à la seconde. Au cours de cette fenêtre de temps, plusieurs événements peuvent se produire comme la fixation de ligand, le transport de composé, la catalyse, ou bien la régulation allostérique. En particulier, l'hémoglobine est une enzyme tétramérique qui possède un mécanisme d'allostérie. La communication entre les différentes sous-unités sont influencés par des effecteurs allostériques qui conditionne l'équilibre en un

état relaxé (R) et un état tendu (T). La communication entre les sous-unités passant par des changements conformationnels apparaît dans la gamme de 1 à 10 μs , d'après des données de spectroscopie optique (C. M. Jones et al. 1992). Un autre exemple sont les moteurs moléculaires comme la dynéine ou kinésine. Ces protéines sont impliquées dans le transport de cargo en se déplaçant le long de microtubules au sein de la cellule. Le déplacement de sous-unités le long des microtubules nécessite l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. De nombreuses études ont pu permettre de calculer la vitesse de déplacement *in vitro* d'environ 400 nm/s dans le cas de la kinésine-1 (Yildiz et al. 2008), et 120 nm/s pour la dynéine (Reck-Peterson et al. 2006).

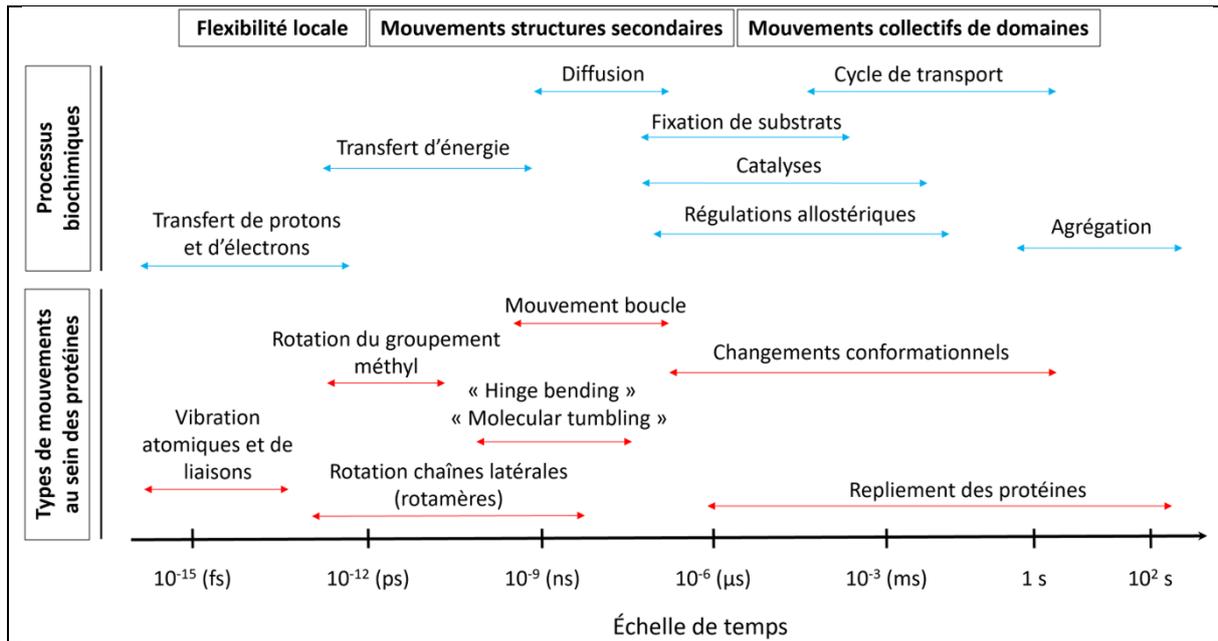
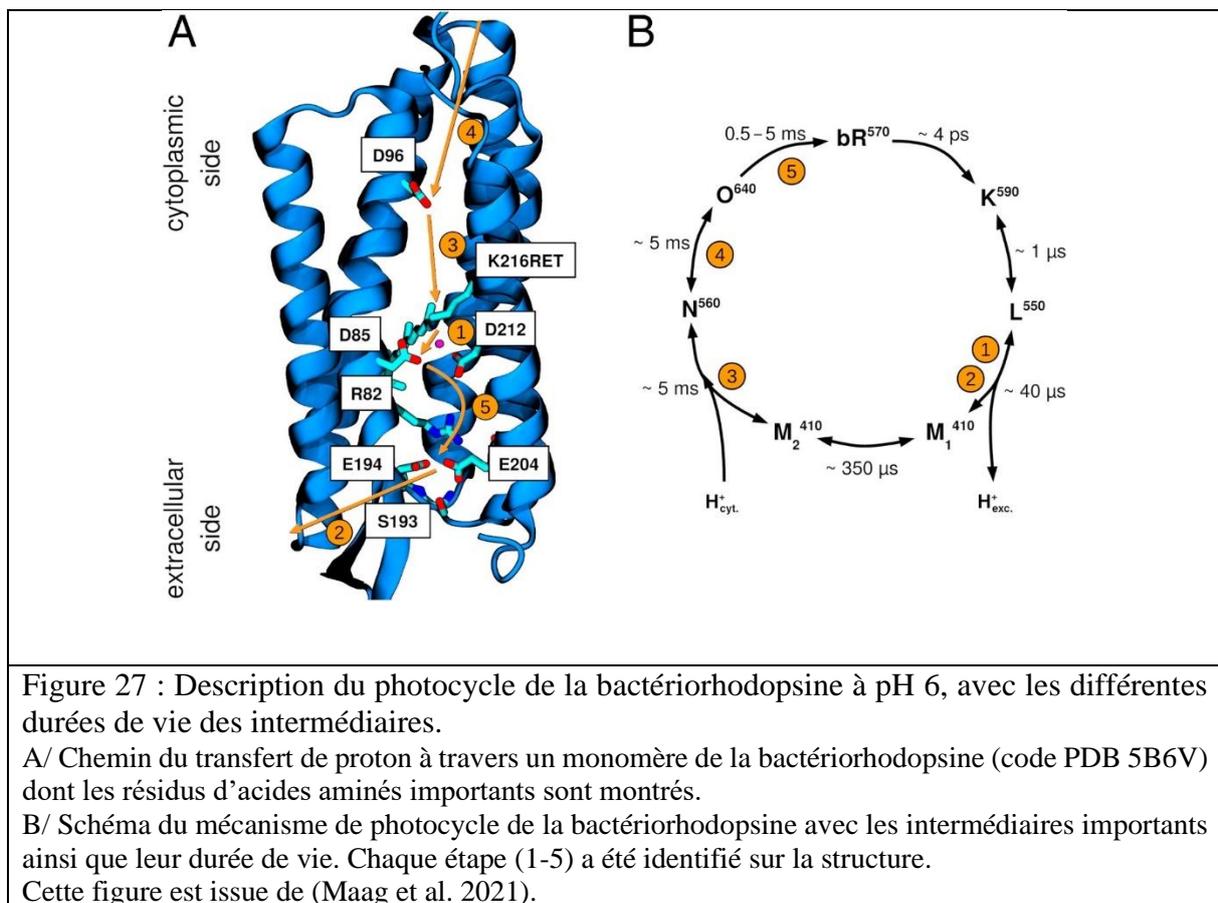


Figure 26 : Échelle temporelle et spatiale au sein des protéines.

Cette représentation indique les types de mouvements et les processus biochimiques possibles chez les protéines selon trois catégories : flexibilité locale, mouvements des structures secondaires, et mouvements collectifs de domaines. L'amplitude des mouvements est souvent corrélée aux temps nécessaires de le réaliser, plus le mouvement est de grande amplitude et plus le temps est important. Par exemple, le mouvement de boucles est de l'ordre de quelques angströms ce qui prend environ de quelques nanosecondes, alors que certains changements conformationnelles au cours d'un cycle de transport peuvent varier de centaines de microsecondes à quelques dizaines de millisecondes. Chaque type de mouvements est associé à un processus biochimique qui se produit pour certaines protéines. Le repliement des protéines est à la fois un processus biochimique et fait intervenir plusieurs types de mouvements pour l'arrangement des structures secondaires entre elles afin de former des structures tertiaires voire quaternaires. Cette représentation résulte de l'agrégation de données recueillies dans diverses références (Fisette et al. 2012; Henzler-Wildman et Kern 2007; Kawale et Burmann 2021; K. H. Nam 2021).

L'intérêt de connaître l'échelle de temps des mouvements impliqués dans la fonction d'une protéine est de déterminer l'ordre chronologique des événements, décrivant le mécanisme de la protéine. Un exemple concret est l'étude du fonctionnement de la bactériorhodospine (bR), un photorécepteur microbien, exprimé par *Halobacterium salinarum*, à l'aide de techniques spectroscopiques, biophysiques et structurales. Sa structure 3D a été la première à être déterminée par cryoEM par l'équipe d'Henderson (Henderson et Unwin 1975). D'un point de vue fonctionnel, cette protéine membranaire joue un rôle de pompe de protons et d'ions

influencé par la lumière (Bondar et al. 2004; Janos K. Lanyi 2000; Neutze et al. 2002). Elle adopte deux conformations dont l'une avec le canal de proton ouvert vers l'espace extracellulaire et l'autre avec le canal ouvert du côté cytoplasmique (J. K. Lanyi 1995). Un chromophore est attaché de façon covalente au résidu de lysine 216 sur l'hélice G, formant une base de Schiff protonée et possède un équilibre thermique entre plusieurs isomères. La photoisomérisation de ce composé induit des changements conformationnels au sein du transporteur pour réaliser le transport de proton à travers la membrane (Subramaniam et al. 1999). Grâce à la collecte de nombreuses données variées, il est possible d'établir un ordre chronologique du mécanisme de transfert de proton par la bactériorhodopsine d'un point de vue mécanistique (Figure 27). Cette description des différentes étapes a été permis par l'utilisation de mutant et surtout par le développements de nouvelles techniques de cristallographie aux rayon X (Caramello et Royant 2024; Panneels et al. 2015; Weinert et al. 2019).



Ces mouvements n'interviennent pas de façon déterministe. Ils sont de nature stochastique, souvent influencés par l'environnement de la protéine, c'est-à-dire, le solvant, la présence de ligand ou l'environnement amphipathique dans le cas des protéines membranaires. La réalisation de ces mouvements sont souvent liés à des aspects thermodynamiques et cinétiques. La description du paysage énergétique d'une protéine permet de mieux comprendre les mouvements impliqués au sein de la protéine pour passer d'une conformation A à B (Figure 28). Plus les barrières énergétiques sont de faibles amplitudes plus les mouvements sont rapides et de courtes distances. Dans le cas de la bactériorhodopsine, les changements conformationnels de grande amplitude après son illumination s'effectuent de l'ordre de la milliseconde (Subramaniam et al. 1999).

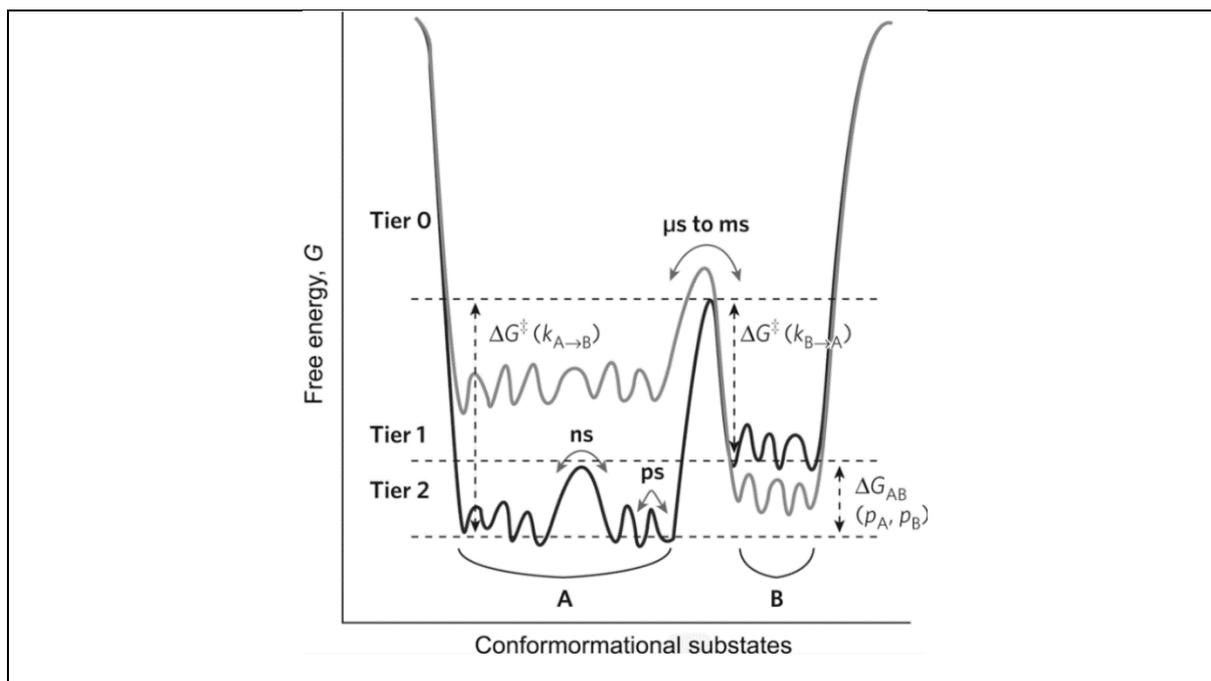


Figure 28 : Représentation du paysage énergétique d'une protéine, décrite par un aspect thermodynamique et les durées de vie des intermédiaires des conformations A et B. Les conformations A et B sont définies par des minimums d'énergie libre, séparés par des barrières énergétiques. Les états de transition sont les maximums d'énergie libre entre les fossés. La dynamique de la protéine est divisée en trois tiers qui ont des durées de vie lente (tiers 0, entre μs et ms) à rapide (tiers 2, ps). La barrière énergétique entre les deux conformations est grande, donc la transition va être plus lente (μs et ms), comparé à des changements des sous-états conformationnels d'une des conformations A ou B. La courbe grise représente le changement du paysage énergétique de la protéine impacté par un paramètre physique (température, pH , ...) ou fonctionnel (fixation d'un substrat, mutation, ...). Cette figure est issue de (Henzler-Wildman et Kern 2007).

La question qui se pose est comment étudier cette dynamique. Plusieurs techniques sont employées pour avoir accès à ces différentes dimensions (Figure 29). Il y a d'abord les techniques spectroscopiques qui couvrent une large gamme de temps, nécessitant souvent des lasers ultra-rapides avec des pulses de plus courte durée que le temps de relaxation du milieu (Haglund 2007). Parmi ces méthodes, les plus employées sont la RMN, le smFRET, la fluorescence, la spectroscopie infrarouge et de Raman (Kovermann, Rogne, et Wolf-Watz 2016; Mazal et Haran 2019; Tumbic, Hossan, et Thielges 2021). Elles apportent notamment des informations thermodynamiques et cinétiques sur les protéines. Toutefois, il est nécessaire de bien caractériser les propriétés spectrales du système afin de faciliter l'interprétation des résultats. Par contre, la structure 3D de la protéine n'est pas déterminée, seulement les effets sur cette dernière. Pour dépasser ce problème, il faut employer des méthodes de biologie structurale comme la cristallographie aux rayons X, SAXS/SANS, ou la cryoEM (Brändén et Neutze 2021; Cho et al. 2021; M. E. Mäeots et Enchev 2022). Elles permettent d'étudier la flexibilité de la protéine à partir de structures statiques en complexe avec d'autres molécules. Depuis quelques années, le développement de ces méthodes ainsi que l'appareillage suscitent un fort intérêt dans la quête de capturer la structure 3D d'une protéine à des temps courts, notamment en cryoEM. Enfin, il y a aussi des techniques bio-informatiques comme les simulations de dynamique moléculaire. L'accès à des temps plus long comme la microseconde voire la milliseconde nécessite de la puissance et du temps de calcul (Kmieciak et al. 2016; Senn et Thiel 2009). Cette

information doit être souvent corrélée avec les observations biochimiques. Néanmoins, ces techniques présentent des avantages et surtout des limites qui conditionnent l'accessibilité à certains ordres de grandeur d'espace et de temps au sein des protéines

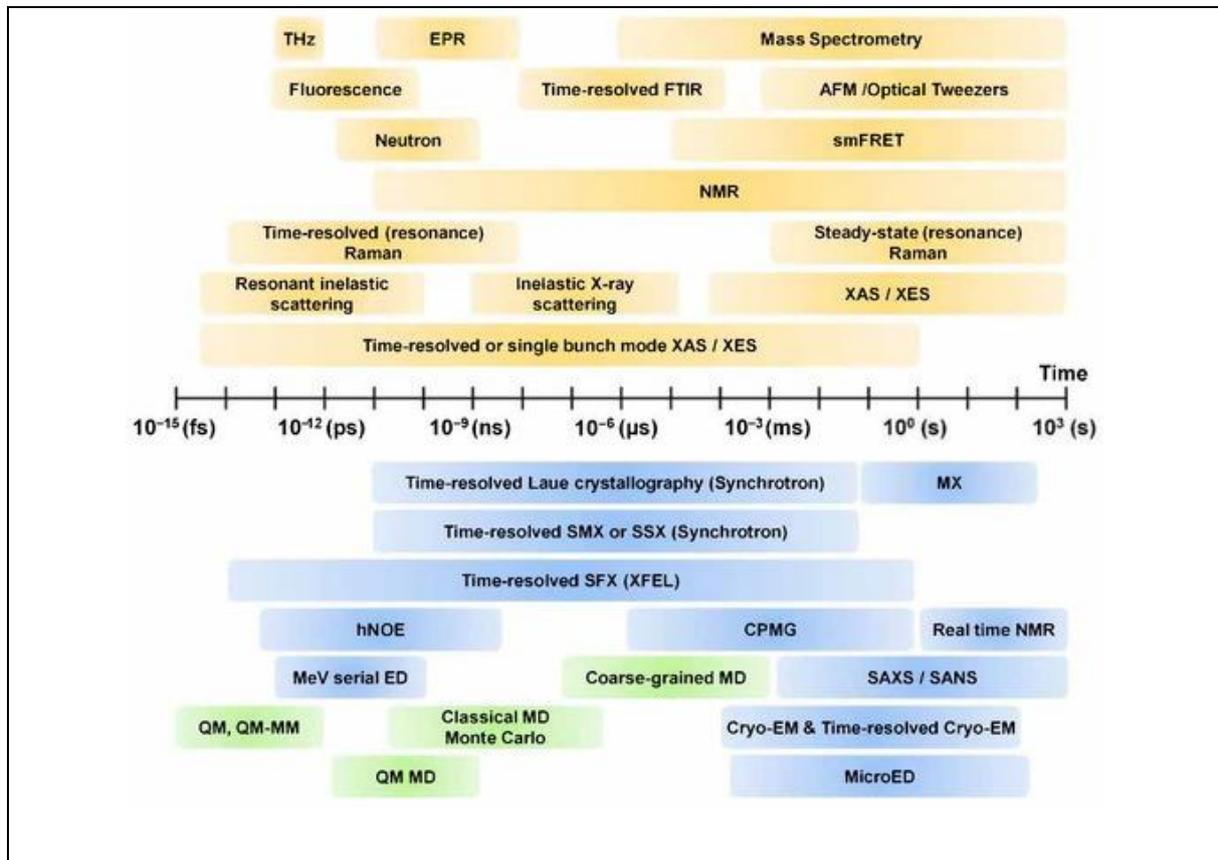


Figure 29: Vue d'ensemble des différentes techniques pour acquérir des informations temporelles et structurales sur le mécanisme des protéines.

Une échelle de temps indique les temps accessibles avec ces techniques. Les techniques colorées en jaune sont des techniques spectroscopiques, en bleu les techniques structurales, et en vert les techniques bio-informatiques.

THz : terahertz spectroscopy, EPR : electron paramagnetic resonance spectroscopy, FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy, smFRET : single molecule fluorescence resonance energy transfer, SMX: serial millisecond crystallography, SSX: serial synchrotron crystallography, SFX: serial femtosecond crystallography, hNOE: heteronuclear nuclear Overhauser effect, CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill, AFM: atomic force microscopy, ED: electron diffraction, SAXS: small angle X-ray scattering, SANS: small angle neutron scattering, MD: molecular dynamics, QM: quantum mechanics, MM: molecular mechanics.

Cette figure est issue de (K. H. Nam 2021).

En résumé, le paradigme structure-fonction d'une protéine doit avoir une vision plus élargie en incluant l'étude de sa dynamique, afin de mieux comprendre son mécanisme. En effet, les protéines ne sont pas statiques, et plusieurs types de mouvements ont lieu, jouant souvent des rôles importants dans des événements intra- et intermoléculaires comme la fixation de substrat, la catalyse, la conversion d'énergie chimique en énergie mécanique, ou la libération de produit. L'identification et la caractérisation de ces mouvements n'est pas une tâche si simple ce qui demande un développement technologique et méthodologique approprié pour le système étudié. Depuis quelques décennies, de nouvelles approches apparaissent avec des résolutions spatiales (jusqu'à l'angström) et temporelles (de la femtoseconde jusqu'à la seconde) de plus en plus performantes. Par ailleurs, ceci représente un des challenges de la biologie structurale pour comprendre et voir en action la protéine, mais cela nécessite d'accéder à une quatrième dimension, le temps (Callaway 2024).

4.2 La cryoEM en temps résolu

La cryoEM nous permet d'avoir accès à la structure 3D d'une protéine à haute résolution ainsi qu'à des conformations différentes, déterminées après le traitement des images. Ces structures sont pourtant statiques et apportent qu'une information partielle sur la dynamique de la protéine. En effet, l'échantillonnage de conformations adoptées par la protéine est limité car ces conformations sont en équilibre thermique dans l'échantillon. Grâce à l'analyse de la variabilité des particules, il est possible de visualiser la flexibilité locale de la protéine à partir d'une conformation stable thermodynamiquement (Punjani et Fleet 2021). Afin d'acquérir les intermédiaires entre ces conformations, le temps est un des paramètres favorables pour se mettre dans des conditions de pré-équilibre, où la proportion d'intermédiaires entre les conformères stables augmente sur la grille. C'est pourquoi, la cryoEM en temps résolu suscite énormément d'intérêt pour cerner la « personnalité » des protéines. Le graal serait d'avoir un film structural de la protéine en pleine action. Par ailleurs, la cryoEM est tout à fait adaptée pour ces études car la préparation d'échantillon est compatible avec certaines réactions biochimiques, le processus de vitrification très rapide, et les logiciels de traitement de données qui sont constamment améliorés (M. Chen et Ludtke 2021; Joachim Frank et Ourmazd 2016; Kasas et al. 2003; Zhong et al. 2021).

Au cours de cette partie, je vais vous détailler les principes, les méthodes et les appareillages à mettre en place qui dépendent fortement de la protéine à étudier. Enfin, je terminerai avec l'étude en temps résolu sur BmrA, notamment sur l'optimisation des conditions biochimiques et structurales en temps résolu.

4.2.1 Les principes

Une première chose à comprendre est que la cryoEM en temps résolu ne va pas donner un ou des intermédiaires conformationnels purs assignés à une étape du processus mais un continuum de conformations (Seitz et al. 2022). Toutefois, cela va impacter sur la reconstruction 3D de la protéine. Pour cela, il faut prendre des précautions sur la préparation de l'échantillon, l'analyse des données cryoEM ainsi que leurs interprétations. Ainsi, l'intérêt de ces études n'est pas seulement de capturer l'intermédiaire manquant mais plutôt d'analyser l'hétérogénéité continue au sein de l'échantillon, pour avoir la représentation la plus juste sur la dynamique de la protéine.

Quels sont les points importants à considérer ?

a. L'échantillon :

La caractérisation biochimique de l'échantillon est une étape nécessaire et importante pour définir la meilleure stratégie à mettre en place pour une étude cryoEM en temps résolu. Le premier point est d'optimiser les conditions de purification pour avoir le meilleur échantillon sur grille, c'est-à-dire qu'il soit pur (sans contaminant), sans agrégation et surtout fonctionnel. Le deuxième point est d'acquérir des données cinétiques par le moyen de techniques d'enzymologie et de spectroscopie. L'objectif est de déterminer les constantes de vitesses des processus enzymatiques et voir si la gamme de temps est compatible avec une approche cryoEM en temps résolu. Si la réaction est assez lente, de l'ordre de la seconde, il est possible de mélanger manuellement les composés avant de déposer sur grille, ou si la réaction est rapide, de l'ordre de la milliseconde, il faudra alors plus s'orienter vers des systèmes de puces microfluidiques avec spray pour réduire le temps de mélange au minimum. C'est le cas pour l'étude du recyclage du ribosome, qui est une des étapes de la synthèse des protéines (Kiel, Kaji, et Kaji 2007). Après l'étape de terminaison, les sous-unités du ribosome sont en complexe avec un ARN de transfert désacétylé dans le site P. Afin de séparer les sous-unités 50S et 30S du ribosome pour avoir un nouveau cycle de synthèse, le facteur de recyclage du ribosome (RRF) et le facteur d'élongation G (EF-G) vont intervenir de façon concertée, et par l'hydrolyse du GTP. Ce processus comporte des transitions entre des intermédiaires structuraux du ribosome qui ont été difficile à déterminer dans des conditions à l'équilibre par cristallographie et cryoEM. Des expériences de cinétiques ont pu montrer que le recyclage du ribosome se déroule lors de la milliseconde (Borg, Pavlov, et Ehrenberg 2016), ce qui explique la difficulté à acquérir des intermédiaires. Ces études ont aussi permis d'estimer les constantes cinétiques à l'aide d'un stopped-flow, en utilisant la diffusion de la lumière Rayleigh à 37 °C. La figure 30 montre le mécanisme enzymatique proposé pour le recyclage du ribosome en complexe avec les facteurs RRF, EG-F, et le GTP (Fu et al. 2016). De plus, ils ont répété ces expériences de cinétique et simulé la proportion d'intermédiaires, après la fixation de RRF, au cours du temps à 26 °C car la préparation de l'échantillon par cryoEM en temps résolu s'effectue à température ambiante. La plupart des constantes cinétiques dans ces conditions sont ralenties. Le choix de la température et des concentrations des facteurs a aussi été des paramètres importants pour influencer sur le temps de la réaction, et donc la proportion d'intermédiaires attendues sur grille.

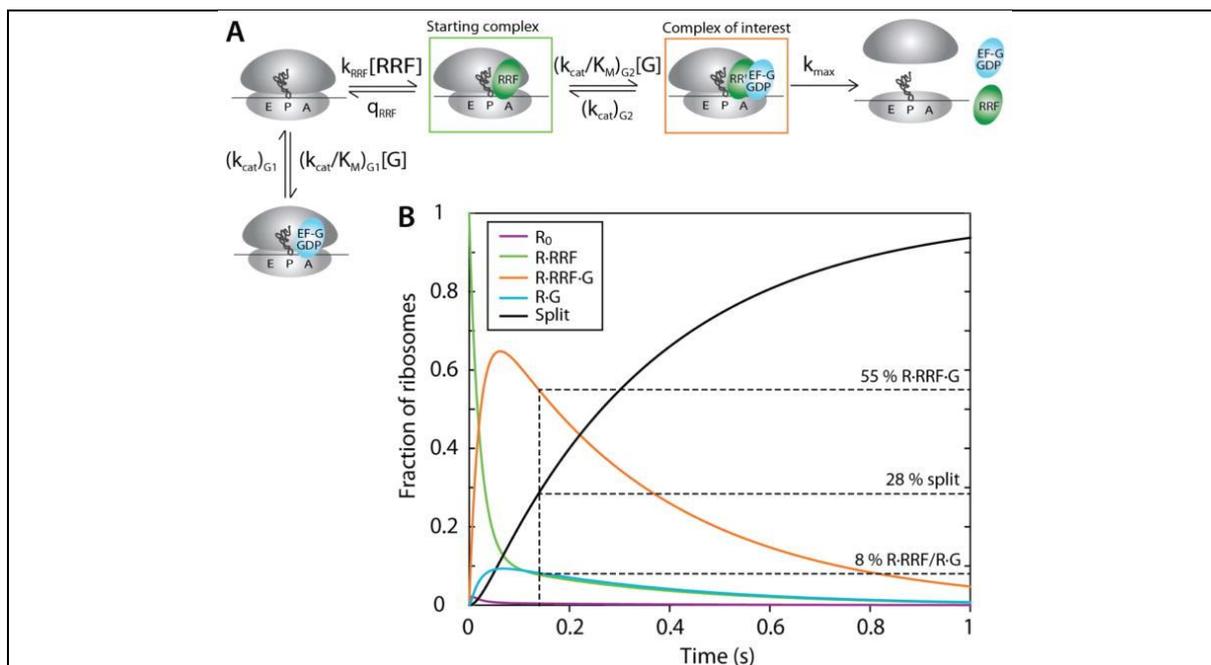


Figure 30 : Modèle proposé pour le processus de recyclage du ribosome.
 A/ Modèle enzymatique pour le recyclage des protéines EF-G et RRF établies d’après les données expérimentales.
 B/ Simulation de la quantité des différents partenaires au cours de ce processus à 26 °C en fonction du temps, à partir du complexe ribosome-RRF pendant l’étape de post-terminaison. La fraction des différents partenaires est prédite à partir du mécanisme réactionnel proposé et des constantes. La ligne noire indique la composition de l’échantillon après 140 ms d’incubation.
 Cette figure est issue de (Fu et al. 2016).

b. Initier la réaction :

L’autre point important, précédemment mentionné, concerne l’initiation de la réaction, en particulier, sur la manière de mélanger les composés entre eux. La synchronisation de l’échantillon est un challenge dans le cas des machines moléculaires qui fonctionnent de façon stochastique. Le simple fait de laisser diffuser les composés sur une grille n’est pas forcément suffisant pour initier la réaction pour chacune des protéines. Par exemple, les protéines diffusent dans une solution avec un coefficient de diffusion de $100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Nauman et al. 2007). Par conséquent, la rapidité et l’efficacité de mélange deviennent vitales pour les processus limités dans le temps. En fonction de l’échelle de temps visée, la stratégie de mélange des composés va être très différente. Il existe de nombreuses façons de mélanger les composés comme un mélange manuel sur la grille elle-même (Siegel et al. 1989) ou dans un tube (Heymann, Conway, et Steven 2004) puis appliqué sur la grille suivit d’un blotting. Au contraire, si le processus se réalise en dessous de la seconde, il est nécessaire d’utiliser des techniques de mélange plus rapide et fiable. Plusieurs approches sont disponibles et seront décrites par la suite. Toutefois, il faut que le mélange soit quasiment le même entre les expériences de cinétiques et en cryoEM, afin d’avoir une corrélation entre les résultats.

Par ailleurs, au lieu de mélanger des composés pour déclencher la réaction enzymatique, il est possible de conditionner l’initiation de la réaction en utilisant des substrats « en cage » (Monteiro et al. 2021). Ce sont des composés qui contiennent la molécule d’intérêt rendue non fonctionnel par modification chimique avec un groupement photosensible.

L'irradiation du composé va libérer la molécule d'intérêt, qui est à nouveau actif (Ellis-Davies 2007). Cela nécessite de concevoir l'appareil de « flash-plunge » et le protocole d'activation par flash suivit de la vitrification (Yoder et al. 2020). Ceci a été testé sur un canal ionique ASICs (acid-sensing ion channels), présent dans l'épithélium, et occupe un état fermé à un pH élevé, ou ouvert avec un pH plus faible. Afin de mimer le changement de pH dans le milieu, ils ont utilisé un sel de sodium qui libère des protons, qui est le MNPS•Na (2-methoxy-5-nitrophenyl sulfate). Ce composé mis sous lumière UV va faire passer le pH de la solution d'un pH 8 à pH 6 en 15 ms. Grâce à ce système, ils ont pu observer la flexibilité de la protéine avec quelques changements conformationnels localisés. Par contre, ils n'ont pas pu être capable de capturer le canal dans un état activé car la fenêtre temporelle de l'ordre de la milliseconde n'était pas suffisante.

c. Ralentir la réaction

Dans le cas où certains processus sont trop rapides à isoler, il y a la possibilité de ralentir la réaction pour augmenter la durée de vie de certains intermédiaires. Un des paramètres faciles à contrôler est la température. Selon la loi d'Arrhénius pour une réaction enzymatique, l'acte catalytique est dépendant de la température ainsi que l'énergie d'activation. L'abaissement de la température va pouvoir ralentir la réaction et influencer sur les conformations adoptées par la protéine. Il a été démontré qu'il est possible de résoudre des structures de protéines par cryoEM à des températures allant de 4 °C à 70 °C (C.-Y. Chen et al. 2019). Ils ont aussi capturé des intermédiaires conformationnels en fonction de la température à l'équilibre. Même dans le cas de l'étude sur le recyclage du ribosome décrit précédemment, ils ont joué sur la température (Fu et al. 2016).

L'utilisation d'analogues de substrats (Lacabanne et al. 2020) ou des inhibiteurs (Alam et al. 2019) peut être aussi une option pour piéger la protéine dans certains états de transitions, afin de décortiquer le mécanisme. Les structures cryoEM acquises par ce moyen à l'équilibre ont montré qu'il est possible de capturer des conformations intermédiaires, par exemple, l'utilisation du vanadate dans le cas des transporteurs ABC, permet de stabiliser l'état de transition juste après l'hydrolyse de l'ATP (J. Chen et al. 2001).

Enfin, l'autre possibilité est d'utiliser des mutants fonctionnels. Autrement dit, les mutants inactifs qui bloquent la protéine dans un état conformationnel en particulier. Ceci permet de visualiser le continuum de conformation de la protéine à des étapes précises de son mécanisme.

Par contre, une bonne caractérisation biochimique de l'échantillon à partir des paramètres physico-chimiques et biochimiques choisis pour ralentir la réaction est primordiale.

d. Stopper la réaction

Pour l'ensemble des techniques cryoEM en temps résolu employées, la réaction est arrêtée une fois que la grille est plongée dans l'éthane liquide. Le temps total de réaction est donc défini par la somme des temps que prennent les étapes de mélange, d'application du mélange, de blotting (s'il est employé), et de plunge-freezing. Ceci va aussi définir les limites théoriques et la résolution temporelle atteignable entre chaque approche (Amann et al. 2023; M. E. Mäeots et Enchev 2022). La figure 31 montre quelques temps sur la préparation de l'échantillon,

l'initiation de la réaction, et la gamme de temps de la réaction. On peut constater que le blotting prend quelques secondes ce qui est contraignant si on veut atteindre des temps plus courts d'où l'utilisation de systèmes de spray. Ainsi, le temps de réaction total doit être le plus court possible pour pouvoir enrichir certaines conformations dans un état de pré-équilibre.

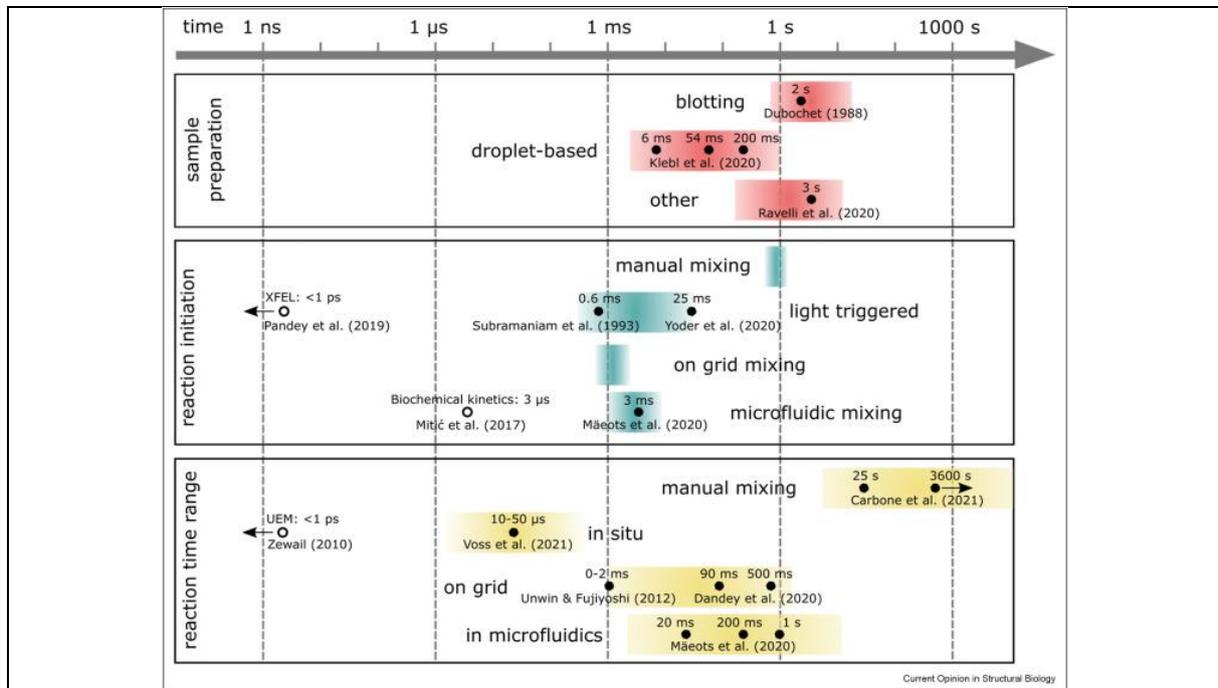


Figure 31 : Vue d'ensemble des échelles de temps accessibles avec les différentes techniques de cryoEM en temps résolu.

Chaque temps sont comparés entre la préparation de l'échantillon, l'initiation de la réaction et la réaction accessible. L'échelle de temps disponible permet d'accéder à une grande variété de mouvements moléculaires, comme ceux de boucles, ou des domaines. Une gamme de temps est estimée, montrée en couleur, et des temps atteints par les techniques, représentés par des cercles noirs remplis. Les cercles noirs vides correspondent aux temps atteints par d'autres techniques autre que la cryoEM. Cette figure est issue de (Klebl, Aspinall, et Muench 2023).

e. Analyse des données cryoEM

L'autre pouvoir de l'analyse en particule unique en cryoEM est d'étudier l'hétérogénéité conformationnelle et de composition. La variabilité entre particules limite l'obtention d'une structure 3D à haute résolution. L'analyse des images et la classification permettent d'assigner les particules à des structures similaires pour la même classe, pour faciliter les affinements. Toutefois, cette hétérogénéité entre particules présente un grand intérêt pour la cryoEM en temps résolu, notamment pour l'étude de la dynamique des protéines. Le fait de se mettre dans des conditions de pré-équilibre sur grille pourrait partiellement définir le paysage conformationnel de la protéine dans des conditions données. C'est pourquoi, le développement de méthodes pour analyser des continums d'états conformationnels est un domaine de recherche très actif. Certains logiciels sont déjà disponibles comme 3DVA, 3Dflex, ou cryoDRGN (Punjani et Fleet 2021, 33, 2023; Zhong et al. 2021), basé sur des approches de classification de variance 3D, de vraisemblance, ou multiréférence (Tang et al. 2023). En sortie, ces analyses donnent des espaces latents (des espaces de conformations). Ceci a été utilisé pour observer la dynamique des protéines de capsides de virus pendant quelques microsecondes (Harder et al. 2023). Pour atteindre cette échelle de temps, ils ont mis des capsides de virus

CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus) en présence d'un photoacide (NPE-caged-proton) activé sous UV (266 nm), qu'ils ont congelés. L'approche consistait à appliquer une irradiation UV sur la grille, ce qui réchauffe partiellement la grille et permet au pH de la solution de passer d'un pH 7,6 à un pH 4,5. La conséquence est que la capsid à de faibles pH se contracte pour être dans un état stable. Une re-vitrification rapide (30 μ s) de l'échantillon se produit piégeant les capsides dans de nouveaux états. Ils ont ensuite réalisé une analyse de la variabilité à l'aide de 3DVA sur cryoSPARC, ce qui a permis d'identifier trois clusters associés aux différents états des capsides (Figure 32). Les auteurs ont conclu sur l'analyse des mouvements de translations et de rotations des protéines au sein des capsides, qu'elles sont impliquées dans des échelles de temps différentes lors de la contraction.

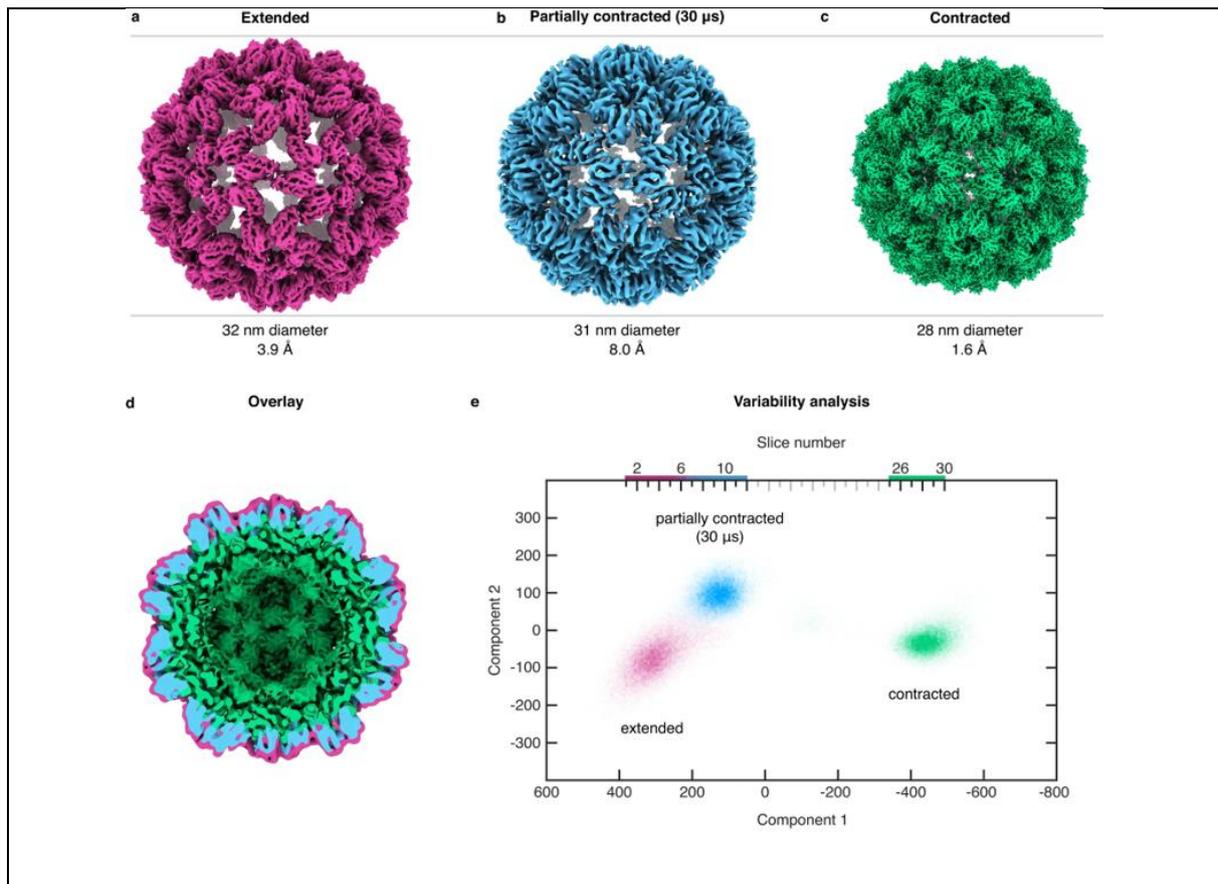


Figure 32 : Structures des différents états de contraction du CCMV et l'analyse de la variabilité entre les particules de ces états

A-C/ Structures 3D à haute résolution de l'état non contracté (congelé à pH 7,6), l'état partiellement contracté (30 μ s après l'illumination par le pulse laser), et la forme entièrement contracté (à pH 5).

D/ Superposition de ces trois états.

E/ Analyse de la variabilité par cryoSPARC. La distribution des particules est montrée en fonction de deux composantes, qui représentent le changement de diamètre de la particule (composant 1) et les mouvements des protéines de capsid (composant 2). Elle a été divisée en 30 le long du composant 1.

Cette figure est issue de (Harder et al. 2023).

Un autre exemple est la description des changements conformationnels réalisés par l'APC/C (RING E3 anaphase-promoting complex/cyclosome) humaine pendant la poly-ubiquitination en utilisant le logiciel cryoDRGN (Bodrug et al. 2023). Ils ont pu analyser l'espace latent en composante principale (PCA), puis ils ont reconstruit le paysage conformationnel et attribué quatre états de cette protéine à l'aide du logiciel UMAP (uniform manifold approximation and projection) (Figure 33).

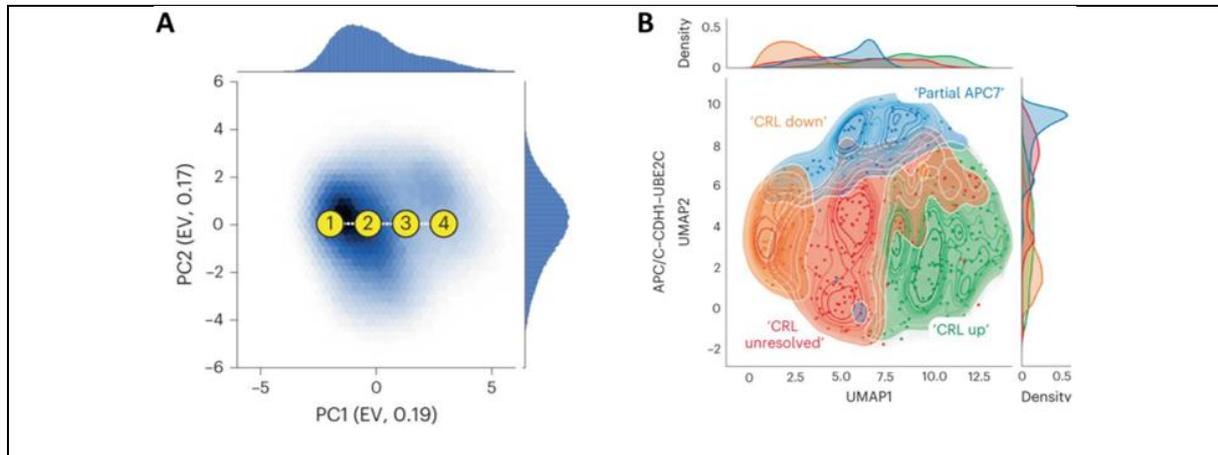


Figure 33 : Reconstruction du paysage conformationnel du complexe de poly-ubiquitination APC/C à l'aide du logiciel cryoDRGN

A/ Représentation de l'analyse par composante principale de la distribution des particules dans l'espace latent. PC1 et PC2 sont les composantes principales qui montrent le mouvement continu d'un domaine de l'APC/C et le changement d'intermédiaires entre deux types de conformations.

B/ Représentation UMAP de la distribution des particules dans l'espace latent en classifiant les clusters en quatre états principaux de l'APC/C présent avec différents partenaires. La distribution des structures peut être analysé par une méthode « k-means clustering » dans l'espace latent, qui classifie et attribue chaque particule à un cluster.

Cette figure est issue de (Bodrug et al. 2023).

L'interprétation de ces espaces latents n'est pas évidente et demande une vision critique sur ce que cela signifie réellement d'un point de vue structural et biochimique (Klindt et al. 2024). En effet, plusieurs niveaux d'information existent dans ces analyses que ce soit la présence de clusters, ou des mouvements de rotations/translations décomposés. Ceci pourrait s'avérer être un outil important dans la résolution de la « personnalité » d'une protéine, ouvrant une nouvelle ère de la biologie structurale et la biochimie.

4.2.2 Les méthodes employées par cryoEM en temps résolu

Plusieurs approches ont été développées depuis le milieu des années 90 dans le domaine de la cryoEM en temps résolu. L'emploi de nouvelles technologies ont vu le jour dans le but d'atteindre des gammes de temps spécifiques. La figure 34 résume l'ensemble de ces méthodes ainsi que les différents temps atteints. Je vais les décrire brièvement avec quelques exemples d'applications.

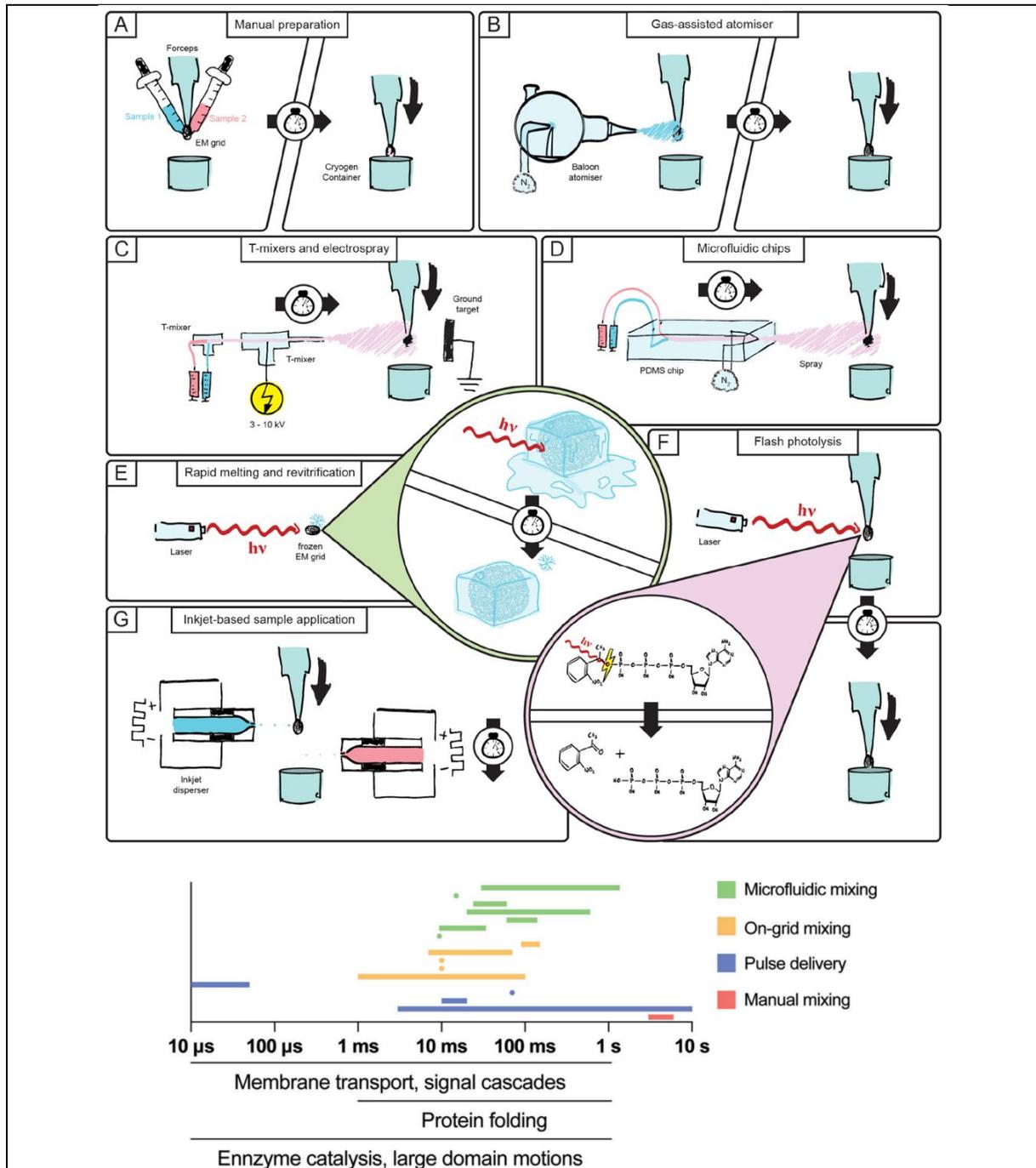


Figure 34 : Vue d'ensemble des approches par cryoEM en temps résolu avec les gammes de temps associées.

Ces figures sont issues de (Amann et al. 2023; M. E. Mäeots et Enchev 2022).

a. Préparation manuelle :

Le principe est de mélanger manuellement les composés puis les déposer sur grille, suivit d'un « blotting » et « plonge-freezing ». Le temps de réaliser ces étapes est de l'ordre de la seconde. Ce système est adapté à des réactions biochimiques lentes ou ralenties. Cette approche a été utilisée avec le récepteur β_2 -adrénergétique en complexe avec la protéine G, en congelant ce complexe à différents temps (5 s, 10 s, 17 s) après l'ajout de GTP (Papasergi-Scott et al. 2023). Ils ont pu identifier 20 structures pendant la transition d'activation et de dissociation de la protéine G. L'analyse 3DVA a permis de décrire l'ordre des événements conduit par la fixation de GTP (Figure 35).

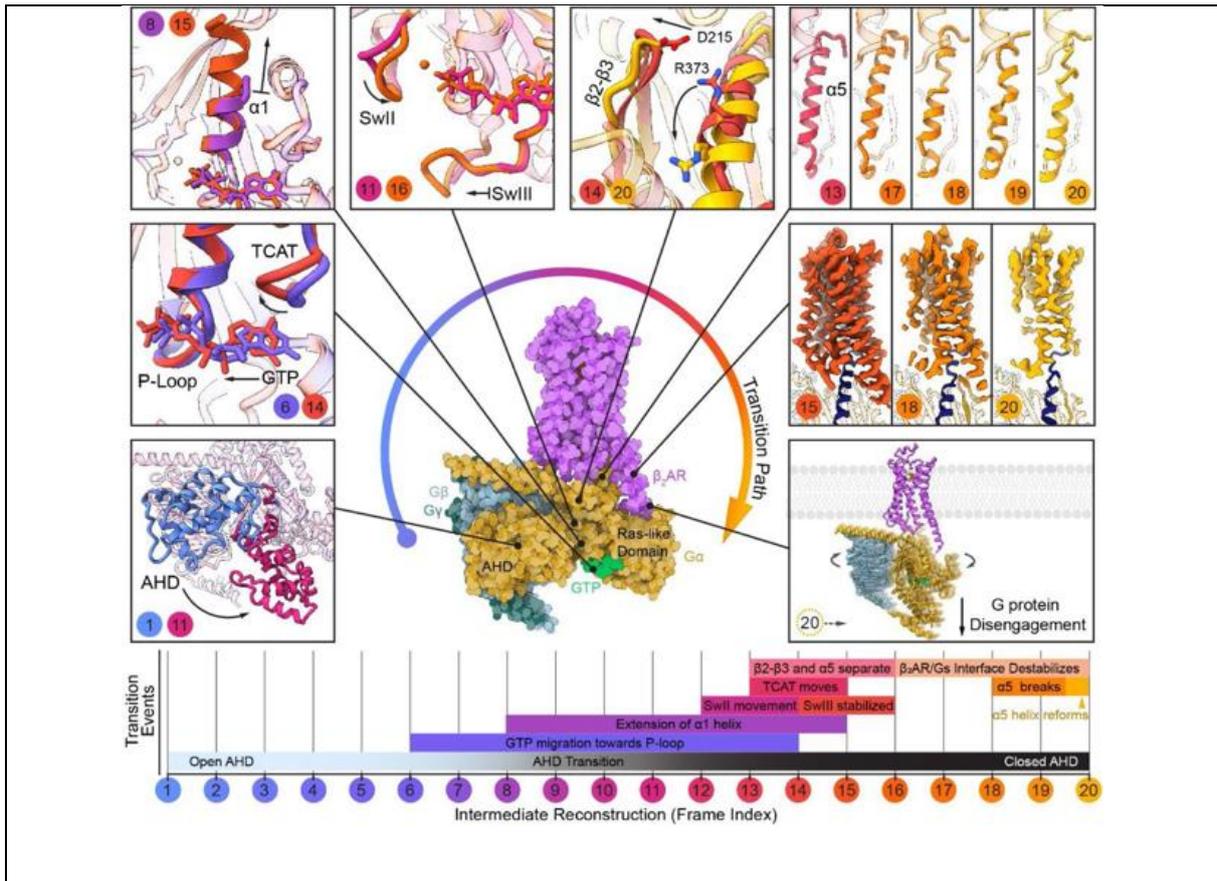


Figure 35 : Chronologie relative des événements de l'activation de la protéine G à la suite d'un échange de nucléotides initiées par une GPCR.

L'attribution des 20 structures aux différents événements a été permis par l'utilisation de l'algorithme 3DVA du logiciel cryoSPARC et par des simulations de dynamiques moléculaires. Ces structures en pré-équilibre ont servi de structures de points de contrôles (« checkpoint structures ») pour aider les dynamiques moléculaires afin de comprendre les dynamiques des protéines. Ces structures suggèrent que la dissociation de la protéine G après la fixation du GTP provoque une propagation de changements structuraux ordonnées à partir du site de fixation des nucléotides jusqu'à l'interface du récepteur GPCR. Le fait de préparer des grilles à différents temps permet de suivre la progression des ensembles conformationnels et renforcer l'agencement des événements.

Cette figure est issue de (Papasergi-Scott et al. 2023).

b. L'atomiseur sous gaz et l'électro-spray (les systèmes de spray) :

Le deuxième système est d'appliquer le premier composé sur la grille, puis d'appliquer le deuxième composé sous forme de gouttelettes à l'aide d'un spray. Il va alors se diffuser sur la grille. Cette approche permet de réduire le temps de réaction à la durée de l'étape « plunge-freezing », c'est-à-dire que le temps atteint correspond théoriquement à celui de l'incubation des composés sur la grille. La résolution temporelle atteinte est comprise entre 1-100 ms (Berriman et Unwin 1994). Il faut néanmoins un volume important d'échantillon (100 μ L/grille). Ce système a été utilisé pour étudier les états transitoires du récepteurs acétylcholine avec l'addition de l'acétylcholine, afin de comprendre son mécanisme allostérique (Unwin et Fujiyoshi 2012). Ils ont déposé le récepteur sur grille, puis effectuer un « blotting » pour avoir un film liquide fin. L'acétylcholine a été ensuite projeté à l'aide d'un spray. Le temps était de 10 ms. Par ailleurs, ils ont ajouté des particules marquées de ferritine pour visualiser la diffusion de l'acétylcholine au niveau des gouttelettes déposées sur grille.

Ce principe a aussi été employé avec un électro-spray dans le but de réduire la taille des gouttelettes ($< 1 \mu\text{m}$) et augmenter leur nombre pour couvrir une surface plus importante sur grille (White et al. 2003). Contrairement au premier système, la consommation d'échantillon est largement moins importante avec un volume de 1 à 2 μ L par grille. Par ailleurs, la qualité des grilles a pu être améliorée, et cela a aussi permis d'obtenir de meilleure résolution dans le cas de l'apoferritine, le ribosome, et les filaments fins cardiaques de porc (Kontziampasis et al. 2019).

c. Les puces microfluidiques :

L'emploi d'une puce microfluidique permet de mélanger les composés entre eux avant de les projeter sur grille à l'aide d'un spray (Kaledhonkar et al. 2018). La possibilité de modifier la conception de la puce permet de varier le temps total de réaction, d'une dizaine à une centaine de milliseconde grâce à l'ajout de lignes de retard, entre le mélange des composés et le spray (Lu et al. 2009). Les différents temps de cette technique sont représentés dans la figure 36. Plusieurs optimisations ont été réalisées au niveau du débit des composés pour le mélange, la quantité d'échantillon utilisées, et la pression du spray (Feng et al. 2017; Lu et al. 2009, 2010; M.-E. Mäeots et al. 2020).

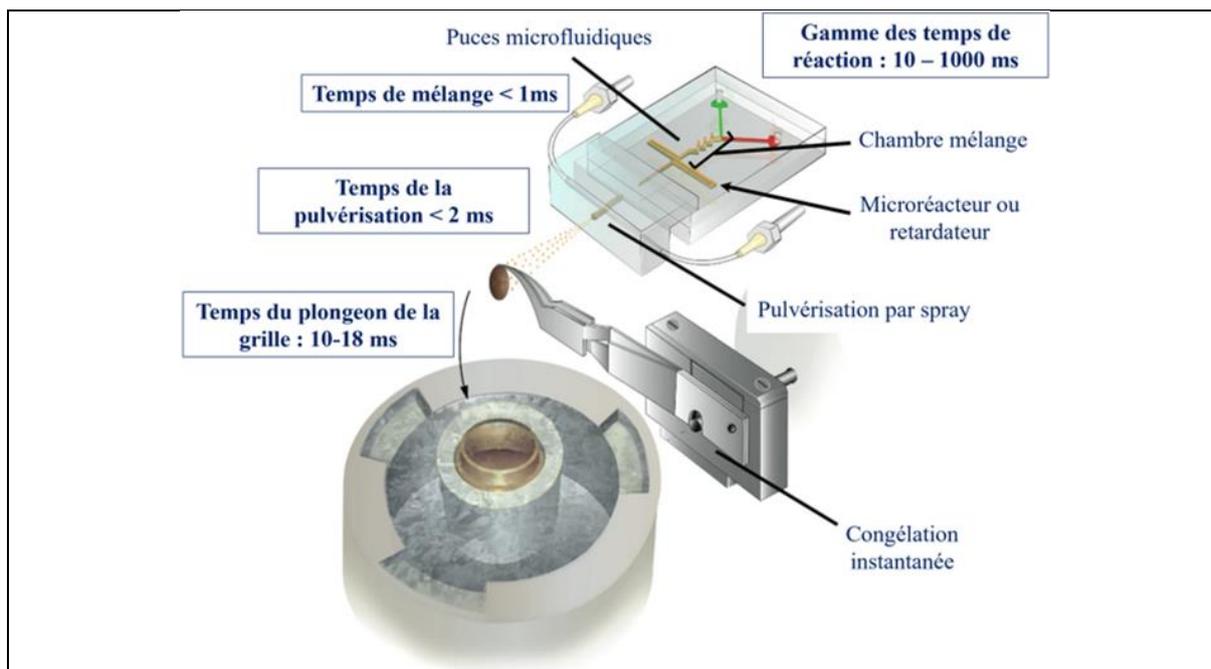


Figure 36 : Système de puce microfluidique

Les deux composés sont introduits dans la puce microfluidique grâce à des pompes péristaltiques, puis ils vont se mélanger dans la chambre de mélange. Le temps de mélange peut être modulé à l'aide de ligne de retard, de quelques dizaines voire centaines de millisecondes. Le mélange est ensuite projeté en microgouttelettes sur la grille à l'aide d'un système de spray. Une fois le mélange déposé sur grille, il n'y a d'étape de « blotting », la grille est directement plongée dans le cryogène. La conception de ces puces est totalement personnalisable, notamment en jouant sur le temps de mélange. Cette figure a été adaptée de (M.-E. Mäeots et al. 2020).

L'équipe de Joachim Frank a conçu une puce microfluidique réutilisable à base de PDMS (polydiméthylsiloxane) pour visualiser le mécanisme de séparation des sous-unités du ribosome 70S assurée par HflX (High frequency of lysogenization X) en présence de GTP (S. Bhattacharjee et al. 2024). Cette puce est composée de 3 modules, dont une chambre de mélange, un microréacteur pour définir le temps de mélange, et un système de spray. La zone de mélange a été recouverte de Si_2O pour limiter l'adsorption non spécifique des composés et assurer la stœchiométrie de la réaction. Au cours de cette étude, ils ont fabriqué 4 puces avec des temps de réaction différents, estimé à 10, 25, 140, et 900 ms. Par contre, ils ont constaté que la qualité de la glace sur la grille était hétérogène. Afin d'avoir le maximum de micrographes exploitables, ils ont développé une stratégie de ciblage sur certaines régions de la grille, notamment celles qui sont au bord de la grille. Ainsi, une classification 3D des particules a permis de capturer 3 intermédiaires structuraux à haute résolution, majoritairement présents dans les trois premiers temps. À partir de 900 ms, ce sont les sous-unités 30S et 50S-HflX séparées qui ont une population de particules plus importante que ces intermédiaires. Une comparaison des structures 3D a aussi été effectuée montrant les détails moléculaires (rotation et translation de certaines hélices) pendant l'ouverture progressive du ribosome 70S.

- d. L'utilisation de lasers pour une photolyse de composés ou un réchauffement-revitrification de la grille congelée :

L'utilisation de substrats « en cage » ou de protéines photo-activables (bactériorhodospine) est un bon moyen d'enclencher la réaction à l'aide d'un pulse laser, connu sous le nom de C-SPAM (cryoEM sample preparation with light-activated molecules) (Montaño Romero, Bonin, et Twomey 2024). D'un point de vue technique, cette approche consiste à appliquer le mélange réactionnel sur la grille, suivi d'un blotting. Pour l'étape de plonge, la grille va passer par une zone illuminée par le laser, ce qui va causer l'activation du substrat. De même, un système de guillotine est couplé pour permettre une congélation ultra-rapide. Le temps de réaction est contrôlé par la distance qui sépare entre la zone d'illumination du laser et l'éthane liquide, montré dans la figure 37. Le temps minimum théorique est de 1 ms. Cette technique présente quelques avantages comme un faible coût, une irradiation de la grille uniforme avec une chaleur minimale appliquée (B. Bhattacharjee et al. 2023).

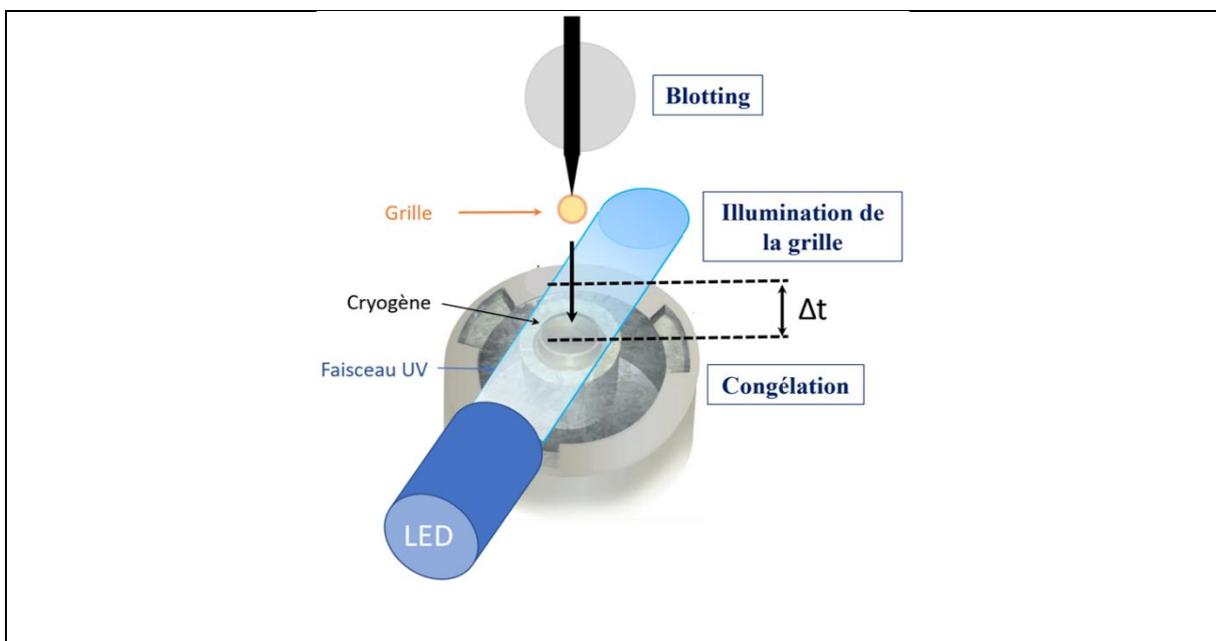


Figure 37 : Système C-SPAM.

L'échantillon est d'abord déposé sur grille. Une étape de blotting est réalisée pour enlever l'excès de liquide. Ensuite, la grille va plonger dans le cryogène en passant par le faisceau émis par la LED avant d'être congelée. A cette étape, la procédure C-SPAM est standardisée et consiste à déclencher l'allumage de la LED au moment où la grille se trouve à la bonne position pour respecter le temps de réaction (Δt). Le temps entre le moment de plonger, l'allumage de la lampe LED et la vitrification de la grille peut être de 1 ms à 100 ms.

Cette figure est adapté de (Montaño Romero, Bonin, et Twomey 2024).

Une autre méthode assez récente proposé par Voss et al a été d'utiliser un laser pour chauffer localement et rapidement une grille (Figure 38) (Voss et al. 2021). Le contrôle de la puissance du laser et la durée de pulse permettent de réchauffer une zone de la grille, passant d'une température de 100 K à 300 K (Harder et al. 2023). Après quelques microsecondes de réchauffement, une re-vitrification de la zone touchée se produit, immobilisant de nouveau l'échantillon dans sa configuration transitoire, sans être cristallisé (Krüger et al. 2024). Cette technique peut être employé avec des systèmes photo-activables décrits précédemment, pour

stimuler la dynamique de la protéine au moment du réchauffement de la zone. La chaleur du laser peut apporter l'énergie à la protéine pour franchir certaines barrières énergétiques.

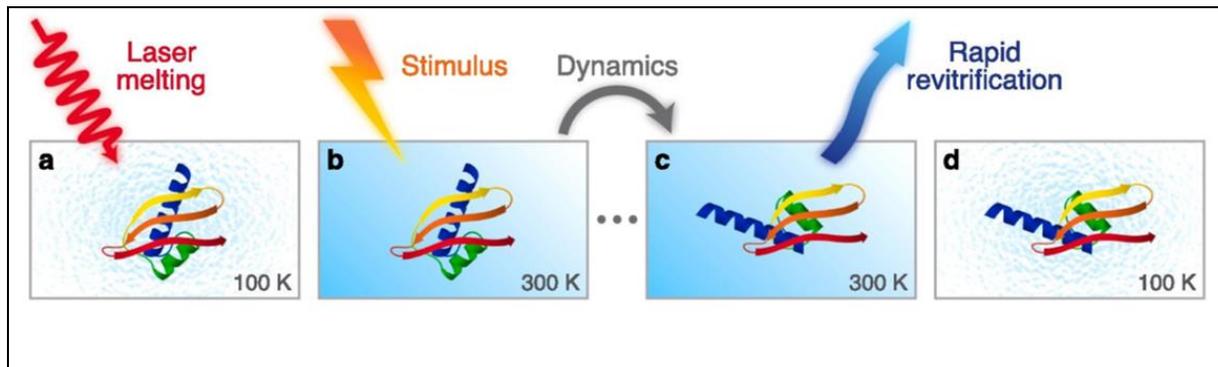


Figure 38 : Système de réchauffement et re-vitrification rapide sur grille à l'aide d'un laser. L'échantillon est déposé sur grille, puis subit un blotting avant d'être congelé rapidement à 100 K. L'échantillon est réchauffé *in situ* avec un laser. La température de l'échantillon va atteindre une température d'environ 300 K ce qui permet à la protéine de redevenir dynamique. Il est possible d'induire cette dynamique avec un stimulus externe à l'aide d'un deuxième laser qui libère un composé en « cage ». Les particules pourront alors effectuer des changements conformationnels de l'ordre de la microseconde avant que la température revienne rapidement à 100 K, revitrifiant l'échantillon. L'échantillon est supporté par un film d'or entre deux couches de graphènes afin d'éviter l'évaporation de l'échantillon dans le vide du microscope au moment d'être réchauffé. Le pulse du laser est d'environ une dizaine de microseconde. La recongélation rapide de l'échantillon est permise par plusieurs facteurs comme un faisceau laser réchauffant localement l'échantillon (la chaleur peut se dissiper rapidement), les barreaux de la grille jouant le rôle de dissipateur de chaleur. Cette figure est issue de (Voss et al. 2021).

e. Application par un injecteur (inkjet-based sample application) :

Un autre système d'application d'échantillon a été développé par l'équipe de Carragher, basé sur un système de jets d'encre piézoélectrique, afin de diminuer la consommation d'échantillon (Jain et al. 2012). L'injecteur va projeter des gouttelettes de picolitres sur la grille, et ainsi appliquer quelques nanolitres d'échantillon sur la grille (Dandey et al. 2020). Les grilles souvent utilisées sont des grilles « self-wicking nanowire » absorbant l'excédent de liquide, par la présence de nanotubes sur le côté des carreaux, ce qui améliore l'épaisseur et la qualité de la glace (Wei et al. 2018). Un autre effet de cette approche est de réduire les effets non désirables causés par l'interface air-eau (Noble, Wei, et al. 2018). Ainsi, il est possible d'appliquer deux sprays avec un temps de la centaine de millisecondes. Ceci a été fait pour regarder l'assemblage du ribosomes 70S, avec dans chacun des sprays la sous unité ribosomique 30 S et 50 S (Dandey et al. 2020).

4.2.3 Limites et challenges de la cryoEM en temps résolu

Les résultats obtenus à partir de ces approches en temps résolu sont assez récents et très prometteurs pour accéder à la dynamique des systèmes biologiques. Cependant, certaines limitations et challenges apparaissent à différents niveaux techniques, analytiques et pratiques.

Le premier frein est l'absence d'appareillage facile d'utilisation. En effet, cela nécessite une expertise avec un coût d'argent et de temps. C'est le cas pour la conception de puces microfluidiques dont leurs personnalisations en fonction du type de mélange et des temps de réaction voulus prennent du temps. L'optimisation des différents paramètres à chaque étape est aussi chronophage comme le choix de la pression pour le spray afin d'éviter de courber la grille lors de l'application de l'échantillon, ou le fait de quantifier l'efficacité de mélange (concentration de particules). Par ailleurs, il faut savoir déterminer la bonne stratégie en fonction de l'échantillon et des questions biologiques qu'on peut se poser pour définir le type de mélange, d'appareillage, d'application de l'échantillon, de grilles, ainsi que la stratégie d'analyse des données cryoEM (choix des micrographes, des particules, classification, analyse de la variabilité). L'idée est néanmoins de rendre plus accessible ces techniques au sein de la communauté de biologie structurale.

L'échelle de temps entre la microseconde et la milliseconde est assez accessible pour les techniques présentées mais la capacité à initier les réactions en dessous de cette gamme restent difficile, et peut être impossible. Il y a des efforts à réaliser d'un point de vue technologique pour augmenter la vitesse de préparation de la grille et du « freezing ». Dans le cas de la cristallographie aux rayons X, il est possible d'atteindre des échelles de temps de la femtoseconde et picoseconde (Barends et al. 2022).

Dans chacune des techniques présentées, la précision de la calibration temporelle est très peu documentée. L'erreur sur l'échelle de temps est un point capital. En effet, il est important de pouvoir couvrir un large champ conformationnel de la protéine tout en dissociant les différents temps afin d'attribuer un ordre et un intervalle chronologique des événements au cours du mécanisme de la protéine. Ceci doit amener à réfléchir sur le développement de référentiel standardisé. Par ailleurs, ceci sous-entend qu'il faut être capable de reproduire les résultats obtenus, ce qui est en pratique contraignant en cryoEM en raison du coût des grilles, de la collecte, et du temps pour l'analyse des données. De ce principe, la capacité de données des informations cinétiques avec des barres d'erreurs se trouvent donc limités avec ces méthodes. Elles ont alors besoin d'être corrélées avec les données biophysiques et biochimiques.

Un des challenges de cette approche concerne l'analyse statistique ainsi que la stratégie mise en place pour classifier le nombre de particule, car l'ensemble de la population des particules doit être représentée avec précision dans l'ensemble des particules. Cela dépend en partie de la qualité des données cryoEM et du choix des particules. En effet, la stratégie de traitement des données dépend à la fois de l'expertise de l'utilisateur et des algorithmes de sélection des particules qui peuvent rejeter des particules de bonnes qualités appartenant à des conformations sous-représentées, ou alors le fait d'enlever de l'analyse des faux positifs et des faux négatifs. Ainsi, il y a un défi sur la reproductibilité des données cryoEM, et la robustesse de l'analyse statistique des particules (Janulien et Moeller 2020).

Enfin, le futur challenge de la microscopie en temps résolu va être d'accéder à ces mêmes informations dans un contexte plus natif car les informations disponibles sont sur des réactions ciblées à partir de protéines individuelles ou de complexes protéiques bien définis. Récemment,

des chercheurs ont démontré comme preuve de concept la possibilité d'utiliser les techniques de cryoEM en temps résolu par tomographie sur un modèle bactérien, *Caulobacter crescentus* (Yoniles et al. 2024). Ils ont mis en évidence, par un système microfluidique couplé à un spray, des changements structuraux de la cellule comme la dissolution de protéines en couche superficielle, la déformation de la membrane externe et des réarrangements cytosoliques de l'ordre de la seconde.

4.3 Aspects dynamiques chez les exportateurs de type IV

Plusieurs informations cinétiques et dynamiques sont présentes dans la littérature sur les exportateurs de type IV comme MRP1, MsbA, TmrAB, et BmrA, qui nous permet d'avoir une idée sur l'ordre des événements au cours du cycle de transport.

Tout d'abord, MRP1 (ABCB1) est un transporteur surexprimé dans certaines cellules cancéreuses, conférant aussi une résistance à de multiples médicaments (Cole 2014). Par l'intermédiaire de la technique smFRET, ils ont démontré des informations mécanistiques en lien avec les découvertes faites dans la première partie du manuscrit, et aussi des informations cinétiques (Wang et al. 2020). La fixation de l'ATP accélère la transition de la conformation IF vers la conformation OF mais cette dernière est très stable ce qui ralentit la transition inverse (Tableau 2). Ainsi, l'étape limitante du cycle est la dissociation des NBDs. Par contre, la présence du ligand LTC4 accélère seulement la première transition mais il influence très peu sur l'hydrolyse de l'ATP, et donc la transition OF vers IF. Ils ont aussi constaté que l'hydrolyse de l'ATP est largement plus rapide que la dissociation des NBDs ce qui est le cas pour la P-gp, TmrAB, et TM287/288 (Bársony et al. 2016; Hofmann et al. 2019; Hutter et al. 2019). La préparation des grilles cryoEM ont été faites en condition de turnover. Ils ont pu capturer deux états distincts des NBDs dimérisés. Le premier est la présence de deux molécules d'ATP dans les NBDs et l'autre avec une molécule d'ATP et une molécule d'ADP. De plus, ceci suggère que le rôle de l'hydrolyse de l'ATP n'est pas seulement d'induire des changements de conformation mais surtout de donner une direction dans le cycle de transport. Par contre, les différences de conditions expérimentales entre le smFRET et la cryoEM rendent difficiles la corrélation entre ces données, notamment avec l'absence de structures intermédiaires de la conformation IF d'après les données smFRET.

Conditions	t_{IF} (s)	t_{OF} (s)
WT, 5 mM ATP	$16,1 \pm 2,2$	$28,8 \pm 4,8$
WT, 5 mM ATP + 10 μ M LTC4	$4,7 \pm 0,8$	$30,8 \pm 5,2$
E1454Q, 5 mM ATP + 10 μ M LTC4	$7,7 \pm 1,5$	$31,7 \pm 5,5$

Tableau 2 : Durée de vie moyenne des conformations IF et OF pour MRP1 sauvage et le mutant E1454Q en présence ou en absence de LTC4, d'après les données smFRET.

Une étude sur le fonctionnement de dimérisation des NBDs chez MsbA a été réalisée à l'aide d'une technique SAXS en temps résolu en couplant un stopped-flow. Cette machine permet de mélanger rapidement la protéine avec l'ATP, puis ce mélange est ensuite exposé à un faisceau de rayons X (Josts et al. 2020). Ils ont étudié la fixation et la dissociation des NBDs seules et avec le transporteur entier reconstitué en nanodisques. Ainsi, ils ont rapporté que le temps nécessaire pour l'association des NBDs était de 480 ms, beaucoup plus rapide que leur dissociation (Tableau 3). Ce temps est d'autant plus rapide lorsque les NBDs ne sont pas exprimés individuellement.

Conditions	Dimérisation (ms)	Dissociation (s)
NBDs seules + ATP	480 ± 100	57 ± 15
MsbA en nanodisques + ATP	50 ± 30	1 ± 0,4

Tableau 3 : Tableau 3 : Constantes de temps obtenus après le fitting des données de SAXS en temps résolu.

Dans le cas de TmrAB, la spectroscopie EPR en temps résolu a démontré que les NBS sont complètement ouverts entre chaque cycle et que le site dégénéré régule la cinétique de la transition de la conformation OF vers la conformation IF car l'état OF est stabilisé pour permettre au ligand d'être libéré de sa poche de fixation (Rudolph, Tampé, et Joseph 2023). Malheureusement, les données cryoEM ne permettent pas d'attribuer les intermédiaires UR (unlocked-return conformation) connus (Hofmann et al. 2019) avec les données spectroscopiques acquises dans cette étude.

En résumé, les données de cinétiques et de dynamiques disponibles sur les exportateurs de type IV ont montré que l'ATP joue un rôle « power stroke » dans la dimérisation et l'enclenchement de changements conformationnels au sein des transporteurs. Cet événement se produit de l'ordre de la centaine de milliseconde. Dans le cadre des transitions entre les états IF et OF, le sens « forward » (IF vers OF) s'impose vis-à-vis du sens « reverse » en raison de la stabilité de la conformation OF et l'étape limitante de relargage des produits. La présence de ligands impact vraisemblablement sur l'étape de dimérisation des NBDs. Le rôle de l'hydrolyse de l'ATP intervient plutôt pour favoriser le sens de retour à la conformation IF. Par contre, la présence d'intermédiaires conformationnels entre ces deux états d'équilibre reste difficile à capturer pour comprendre l'enchaînement des événements du cycle de transport. Enfin, les détails mécanistiques entre chaque exportateur de type IV semblent leurs être spécifiques.

4.4 Données biochimiques et structurales sur BmrA en temps résolu

La première partie du manuscrit s'est focalisée sur l'étude structurale et fonctionnelle du mutant E504A à l'équilibre. Toutefois, les informations cinétiques sur cette transition entre les conformations IF et OF n'ont pas été exploitées. Récemment, une étude sur la dynamique de ce transporteur a été réalisée en liposome à l'aide de la technique smFRET (Damm et al. 2024). Ils ont pu identifier deux populations IF et OF, mais ils n'ont pas pu détecter de potentiel intermédiaires conformationnels entre ces deux états. Les raisons mis en avant pour l'expliquer sont que les conditions expérimentales, notamment la température ambiante (20 °C) lors de la mesure, ne permettent pas de détecter les transitions conformationnelles. En particulier, ils ont pu calculer la durée de vie de l'état OF qui d'après eux est plus de 7 s à cette température.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la caractérisation structurale et fonctionnelle de BmrA en détergent en temps résolu. J'ai optimisé et déterminé les conditions pour réaliser ces mesures. L'intérêt de cette étude est d'apporter plus d'informations au niveau cinétique et dynamique à propos du mécanisme de BmrA.

4.4.1 Caractérisation biochimique de BmrA par fluorescence

Au début du projet, j'ai commencé par le mutant inactif E504A en DDM-cholate car il permet d'avoir une transition unidirectionnelle entre les conformations IF et OF. Je l'ai caractérisée à l'aide de sa fluorescence intrinsèque. En effet, ce transporteur possède 3 résidus de tryptophane par monomère, qui sont les résidus n°104, 164, et 413. La figure 39 montre l'endroit où se trouve les résidus dans la structure.

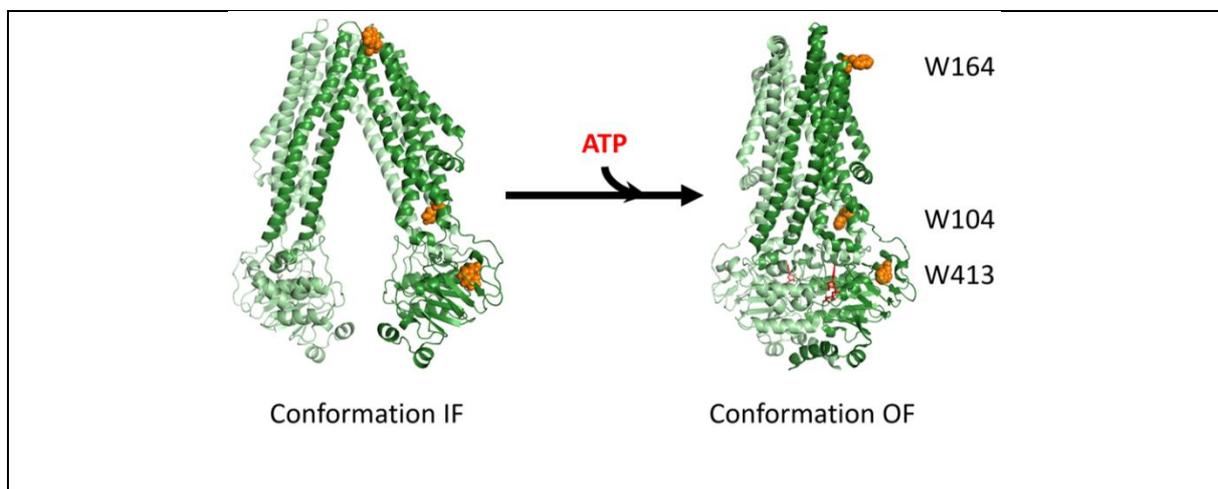


Figure 39 : Localisation des résidus de tryptophane au niveau d'un monomère (vert foncé) du mutant inactif E504A.

Le résidu n°104 se situe à la fin de l'hélice TM2, proche de l'interface NBD et TMD. Le résidu n°164 se situe dans une boucle extracellulaire entre les hélices TM3 et TM4. Le résidu n° 413 se situe dans les NBDs, entre le motif Walker A et la Q-loop du sous-domaine RecA-like. Ces résidus sont présents dans l'autre monomère aux mêmes positions.

La conformation IF est la structure 3D de la partie 1 en absence de ligand et la conformation OF est la structure 3D code PDB 7OW8.

Le suivi de la fluorescence intrinsèque de BmrA au cours du temps a été réalisé à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS Xenius. Plusieurs optimisations ont été réalisées au niveau des paramètres de voltage du photomultiplicateur, des fenêtres d'excitation et d'émission pour avoir le plus de signal possible, tout en évitant un photobleaching. Le protocole consiste à mesurer l'intensité de fluorescence de BmrA à 328 nm (longueur d'onde d'émission maximale) et d'ajouter d'abord le ligand (R6G), puis le substrat (ATP-Mg²⁺) (Figure 40). La R6G va réaliser une atténuation de la fluorescence des résidus tryptophane de BmrA. L'ATP est ensuite ajouté ce qui provoque une augmentation de la fluorescence de plus de 5 % d'intensité, qui suit une courbe mono-exponentielle atteignant un plateau après 1 min d'incubation. A partir de ce profil, nous avons émis l'hypothèse que le changement de fluorescence était dû à un changement de population de la protéine passant de la conformation IF à la conformation OF après la fixation d'ATP.

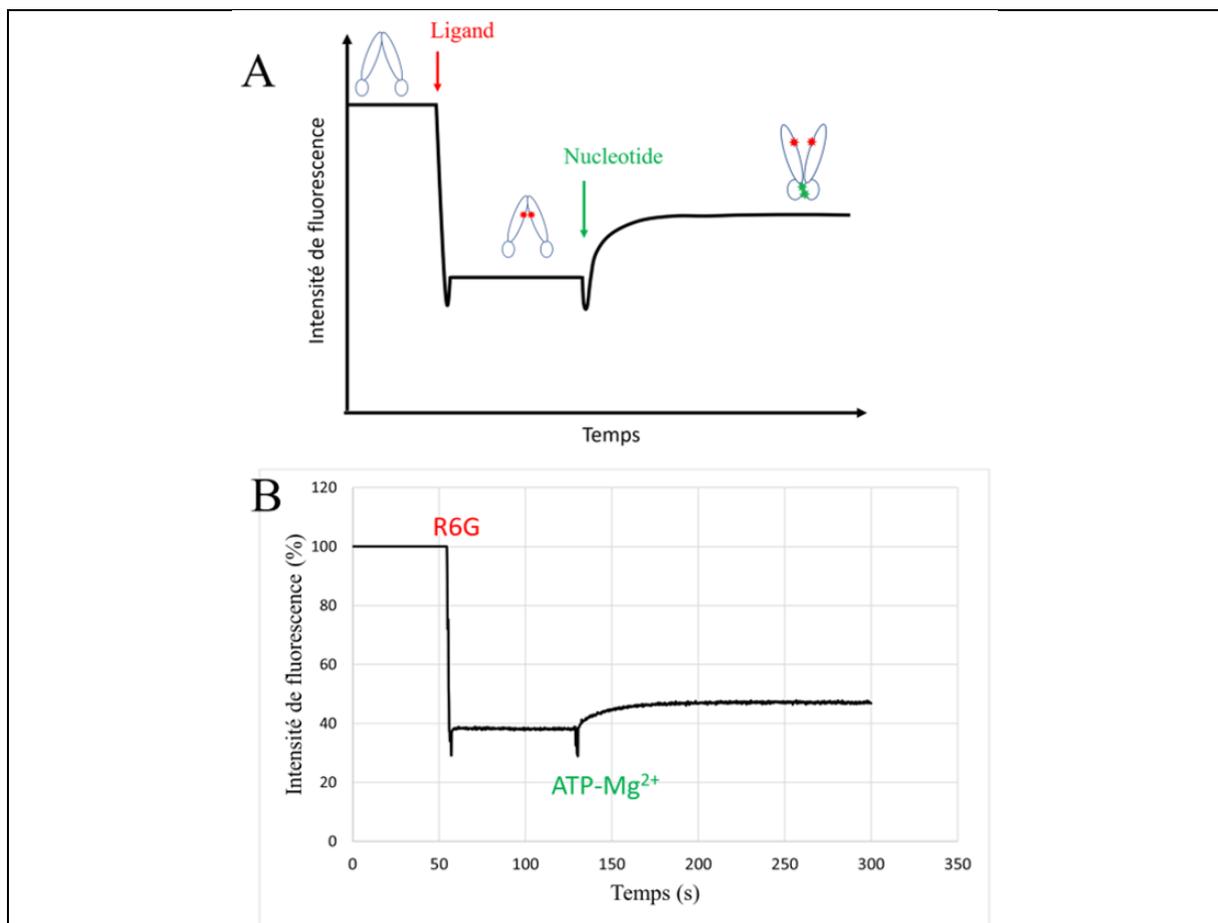


Figure 40 : Procédure de suivi de la fluorescence intrinsèque de BmrA au cours du temps.

A/ Courbe théorique du phénomène. B/ Courbe expérimentale. BmrA est en DDM-cholate et l'ajout successif des réactifs sont en DDM-cholate. L'ajout de ligand provoque une atténuation de la fluorescence, et notamment la R6G atténue la fluorescence de BmrA d'environ 60 %. La fluorescence reste stable avant et après l'ajout de ligands. Après l'ajout d'ATP, le niveau de fluorescence augmente pour atteindre un plateau d'environ 7-10 % d'intensité par rapport à la ligne de base avant l'ajout d'ATP. Ceci traduit le changement de conformation, en particulier, le changement de population de protéines d'une conformation IF vers une conformation OF. Les pics sont des artéfacts dû à aux mélanges des composés et sûrement le passage du cône en face du faisceau.

Dans la littérature, de nombreuses observations montrent que les changements de conformation influencent la fluorescence intrinsèque des protéines en raison du changement d'environnement des résidus aromatiques, essentiellement les tryptophanes. Ceci peut se manifester soit par un changement de l'intensité de fluorescence ou par le déplacement de la longueur d'onde d'émission (Hevekerl, Tornmalm, et Widengren 2016). Dans le cas de BmrA, l'environnement de ces résidus de tryptophane change entre les conformations IF et OF. En première approche, j'ai déterminé l'accessibilité relative au solvant de ces résidus à l'aide de l'outil PyMol, à partir des structures 3D en IF (issues de la partie 1) et OF (code PDB : 7OW8 et 7BG4) en absence ou en présence de ligands. L'accessibilité relative au solvant est calculée en faisant le rapport de la surface accessible au solvant pour le résidu sur sa surface maximale accessible au solvant, exprimé en pourcentage (Tien et al. 2013) (Tableau 4). L'environnement du résidu 164 reste assez hydrophile et change très peu quel que soit les conditions, à part dans la conformation OF en présence de R6G avec une accessibilité au solvant de 90 %. Par contre, l'environnement des résidus 104 et 413 varie entre les deux conformations. Même si leurs environnements restent assez peu accessibles au solvant, ils le sont encore moins dans la conformation OF. A priori le changement de fluorescence observé précédemment serait dû à ces deux résidus de tryptophane n° 104 et 413. Pour confirmer cette affirmation, il faudrait réaliser des mutants de ces résidus pour regarder leur impact sur la fluorescence intrinsèque. Ceci a été réalisé dans une étude visant à étudier la stabilité thermodynamique et le dépliement des domaines individuels (NBDs et TMDs) de BmrA dans le contexte de la protéine sauvage entière (Oepen, Mater, et Schneider 2023). La mutation du résidu 413 a un énorme impact sur la fluorescence intrinsèque mais aussi sur la fonction de la protéine. Il jouerait le rôle de relai dans la communication entre NBD-TMD (Javed 2020; Steinfels et al. 2004). Un autre phénomène est à considérer est l'exposition de ces résidus vis-à-vis de la R6G. Le passage à la conformation OF rend l'exposition des résidus n°104 et 413 moins importante à la R6G ce qui peut aussi expliquer le « déquenching » observé (l'augmentation de la fluorescence intrinsèque). En effet, la R6G est un colorant qui réalise un quenching statique avec les résidus aromatiques ce qui a été montré avec l'hémoglobine (Mandal, Bardhan, et Ganguly 2010).

Résidu n°	Accessibilité relative au solvant (%)			
	Conformation IF (apo)		Conformation OF (ATP)	
104	7	5	1	0
164	72	72	67	67
413	16	16	4	4
Résidu n°	Conformation IF (R6G)		Conformation OF (R6G + ATP)	
104	15	8	2	5
164	72	70	92	90
413	17	16	8	6

Tableau 4 : Accessibilité des résidus tryptophane au solvant du mutant E504A.

La conformation IF (apo) est issue de la structure 3D du jeu R et la conformation IF (R6G) est la structure 3D du jeu O de la partie 1. La conformation OF (ATP) est la structure 3D en présence de 5 mM d'ATP (code PDB : 7OW8) et la conformation OF (R6G + ATP) est la structure 3D en présence de 100 µM de R6G et 5 mM d'ATP (code PDB : 7BG4). Ce pourcentage d'accessibilité relative au

solvant par résidu a été calculé à l'aide du logiciel PyMol avec la commande : Select W > Action > Compute > Surface area > per residue (relative sol. acc.).

Afin de mieux caractériser ce phénomène, j'ai effectué plusieurs contrôles (Figure 41). L'ensemble de ces contrôles a été effectué en triplicats pour chaque lot de protéines purifiées. Le premier contrôle (Figure 41A) consiste à ajouter la R6G et l'ATP dans le tampon (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, 0,035 % DDM, 0,03 % Cholate) pour vérifier si l'ajout et le mélange manuel des composés n'induisait pas des effets non spécifiques sur la fluorescence à 328 nm. Les pics présents sont dus aux cônes de pipette qui passe devant le faisceau UV. La fluorescence ne présente aucune augmentation ou diminution après chaque ajout de composés.

Ensuite, le deuxième contrôle (Figure 41B) est d'ajouter du tampon à la place de l'ATP en présence de la protéine. La fluorescence a le même niveau d'intensité, ce qui renforce l'hypothèse que l'intensité de fluorescence est liée à la quantité de protéine en conformation OF. Par ailleurs, un autre contrôle (Figure 41C) a été d'utiliser le NATA, un analogue du tryptophane libre en solution (environnement hydrophile), à la place de la protéine. La concentration de NATA a été calculée pour avoir la même quantité de tryptophane que ceux de BmrA. Nous pouvons observer que la R6G réduit de moitié la fluorescence du NATA, mais l'ajout d'ATP n'affecte pas son intensité. Par contre, le niveau d'intensité de fluorescence du NATA au début de la cinétique n'est pas le même que celui de la protéine, à 45 % au lieu de 70 %. Cette différence s'explique par la longueur d'onde maximale d'émission du NATA qui est à 354 nm. De plus, la dénaturation de BmrA (Figure 41D) par la chaleur et le SDS atteint ce même niveau en début de cinétique (la longueur d'onde maximal d'émission était à 354 nm, montrant l'exposition des résidus de tryptophane exposés au solvant), et l'ajout d'ATP n'affecte pas la fluorescence car il n'y a pas de changement de conformation vu que la protéine a été dénaturée.

Enfin, l'ajout d'ADP à la place d'ATP ne change pas l'intensité de fluorescence de BmrA (Figure 41E et 41F). En effet, la fixation d'ADP possède une constante d'affinité de l'ordre du millimolaire et ne favorise pas la formation des NBS. Ainsi, l'absence d'augmentation lors de la mesure démontre bien que la dimérisation des NBDs, et donc le changement de conformation est associé à l'augmentation de la fluorescence.

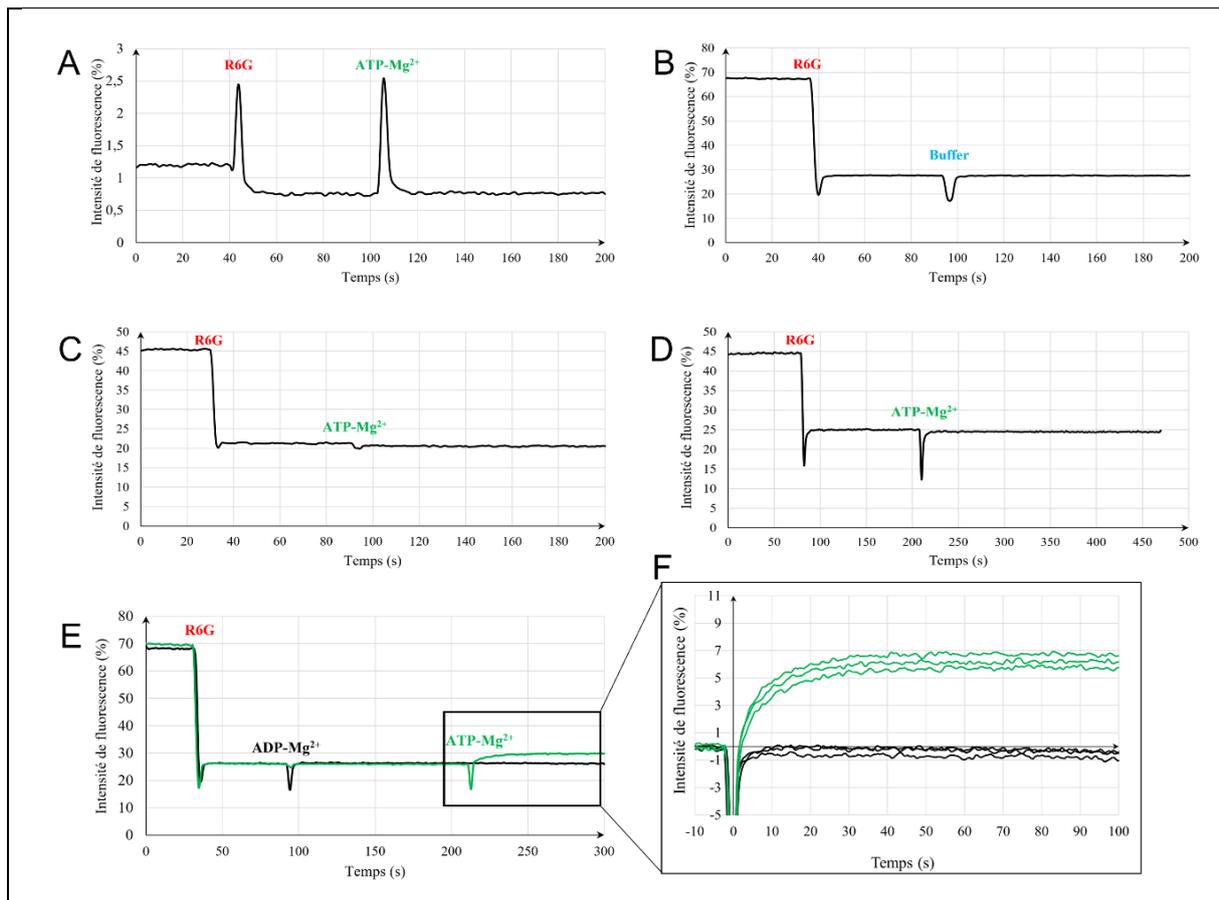


Figure 41 : Les contrôles sur la fluorescence intrinsèque du mutant E504A en DDM-cholate. Les cinétiques de fluorescence ont été effectués à 328 nm. Le volume de chaque composé est le même (10 μ L) dans un volume final de 200 μ L.

A/ Tampon de la protéine (HEPES 20 mM pH7,5, NaCl 100 mM, 0,035 % DDM, 0,03 % Cholate) avec l'ajout de R6G (50 μ M) et d'ATP-Mg²⁺ (300 μ M).

B/ BmrA-E504A (2 μ M) avec l'ajout de R6G (50 μ M) et du tampon.

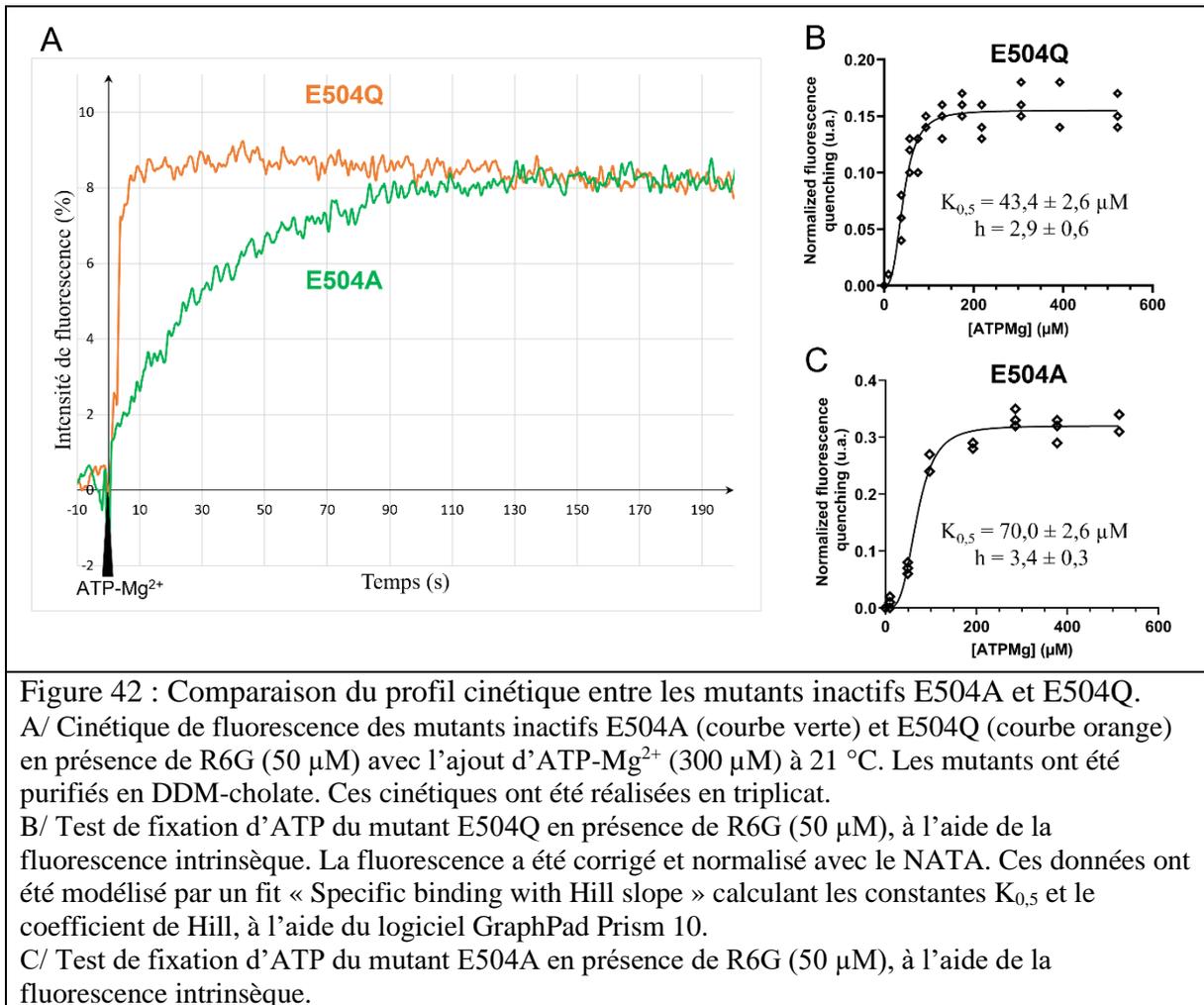
C/ NATA (6 μ M) avec l'ajout de R6G (50 μ M) et d'ATP-Mg²⁺ (300 μ M).

D/ BmrA-E504A (2 μ M) dénaturé par du SDS chauffé pendant 10 min à 90 °C, avec l'ajout de R6G (50 μ M) et d'ATP-Mg²⁺ (300 μ M).

E/ BmrA-E504A (2 μ M) avec l'ajout d'ADP-Mg²⁺ (300 μ M) (courbe noire et verte) et d'ATP-Mg²⁺ (300 μ M) (courbe verte).

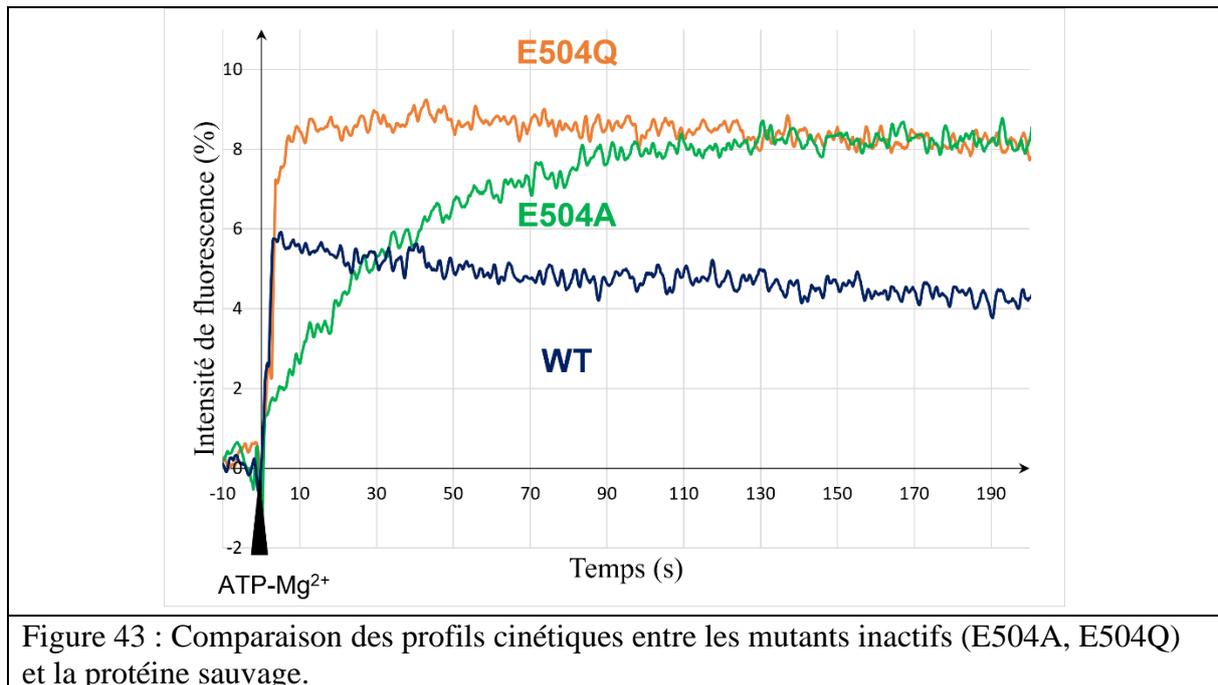
F/ Zoom après l'ajout soit d'ADP-Mg²⁺ (courbe noire) ou d'ATP-Mg²⁺ (courbe verte).

De plus, j'ai aussi testé cette procédure avec un autre mutant inactif, E504Q, qui empêche aussi l'hydrolyse de l'ATP et piège BmrA dans la conformation OF (Orelle et al. 2003). Le profil est une courbe de double exponentiel après l'ajout d'ATP, avec un plateau de même amplitude que E504A (Figure 42A). Par contre, la cinétique est deux fois plus importante avec ce mutant. Il semblerait que la transition IF vers OF soit plus rapide. La différence est le changement du résidu d'alanine (résidu hydrophobe) par un résidu de glutamine qui impact légèrement l'affinité pour l'ATP, avec un meilleur $K_{0,5}$ de $43 \mu\text{M}$ pour E504Q. Une explication serait que le résidu de glutamine est capable de former des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes avec la molécule d'eau et l'ATP, contrairement à un résidu d'alanine, ce qui favoriserait le sens direct de la transition.



De plus, j'ai aussi testé la protéine sauvage. Le profil est biphasique (Figure 43) avec un premier phénomène qui est une augmentation rapide de l'intensité (inférieur à 1 seconde), similaire à celui du mutant E504Q. Cette étape correspond à l'augmentation de la population protéique dans la conformation OF après l'ajout d'ATP. Par contre, la fluorescence n'atteint seulement que les $\frac{3}{4}$ de l'amplitude du plateau des mutants. En effet, la protéine sauvage est capable de catalyser l'hydrolyse de l'ATP, donc de revenir à la conformation IF. Le deuxième phénomène est une diminution lente de la fluorescence qui semble traduire cette hydrolyse d'ATP, et donc les cycles entre les conformations IF et OF. Au cours du temps, la population de conformation

OF diminue car la quantité d'ATP est hydrolysé par BmrA ce qui augmente la population de conformation IF. Par ailleurs, la fluorescence atteint la ligne de base au bout de 30 min.



Le mutant E504A semble être le bon candidat pour une caractérisation structural par cryoEM en temps résolu. En effet, il ralentit le changement de population vis-à-vis du mutant E504Q et la protéine sauvage. Pour cela, j'ai déterminé les meilleures conditions de température et de concentration d'ATP (Figure 44) dans le cas du mutant E504A pour que ce soit réalisable par cryoEM en temps résolu. J'ai d'abord testé différentes températures, allant de 13 °C à 35 °C (Figure 44a). Les conditions en température ambiante (20-25 °C) sont idéales pour que la cinétique ne soit ni trop rapide ni trop longue, ainsi que les conditions de préparation de la grille en vitrobot. De plus, j'ai testé différentes concentrations d'ATP. J'ai choisi d'utiliser une concentration de 300 μ M d'ATP car le temps pour mélanger manuellement les composés puis déposer sur grille peut se faire en quelques secondes.

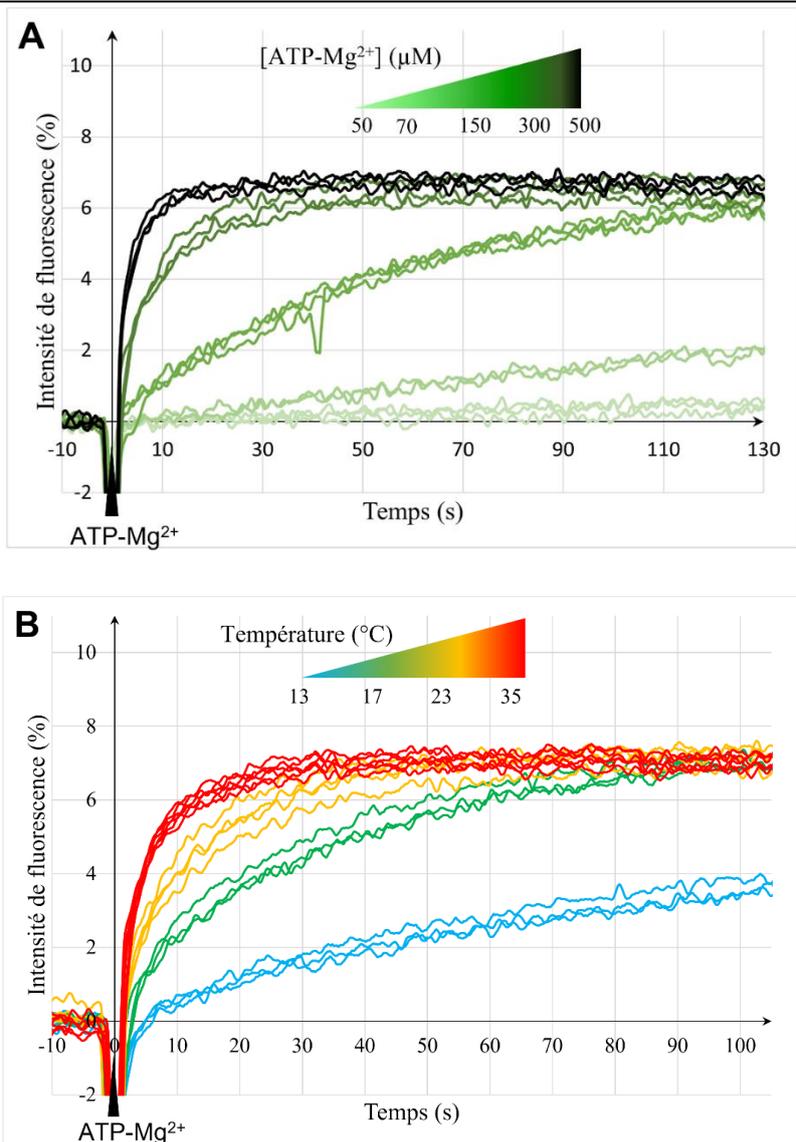


Figure 44 : Tests de la température et de la concentration d'ATP.

A/ Test des différentes concentrations d'ATP sur le mutant E504A en présence de R6G (50 μM).

B/ Test des différentes températures sur le mutant E504A en présence de R6G (50 μM).

L'ajout des triplicats montrent la reproductibilité des expériences.

4.4.2 Acquisition de données de cinétiques sur BmrA par stopped-flow

Les données acquises sur le spectrofluorimètre (SAFAS Xenius) nous empêchent d'accéder aux temps les plus courts en dessous de 5 s, car ce temps correspond à l'ajout et le mélange des composés dans la cuve. Pour surmonter ce problème, j'ai réalisé des expériences de cinétiques à l'aide de l'appareil « SF-61 DX2 Double Mixing Stopped-Flow System » (HI-TECH Scientific), en collaboration avec le Dr. Corinne Lionne à Montpellier (Figure 45). Le principe de cet appareil est d'injecter les réactifs (A et B), à l'aide de seringues, dans une chambre de mélange. Le mélange des composés est alors stoppé par une seringue d'arrêt qui amène ce flux dans une cellule d'observation, illuminée par un faisceau UV à une longueur d'onde de 290 nm. Un détecteur à 90° permet de mesurer la fluorescence intrinsèque de la protéine au cours du temps.

A l'aide de cet appareil, j'ai testé une gamme de concentration d'ATP sur BmrA en DDM-cholate. L'acquisition de ces cinétiques permettent d'extraire des paramètres cinétiques et d'établir un modèle enzymatique sur la fixation d'ATP et le changement de conformation de BmrA. Ces expériences ont été réalisés sur les mutants E504A et E504Q ainsi que la protéine sauvage (WT). La R6G a été ajouté et laissé incuber avec la protéine pendant au moins 5 min avant d'être mise dans la seringue. Ces expériences ont été réalisées à 21 °C.

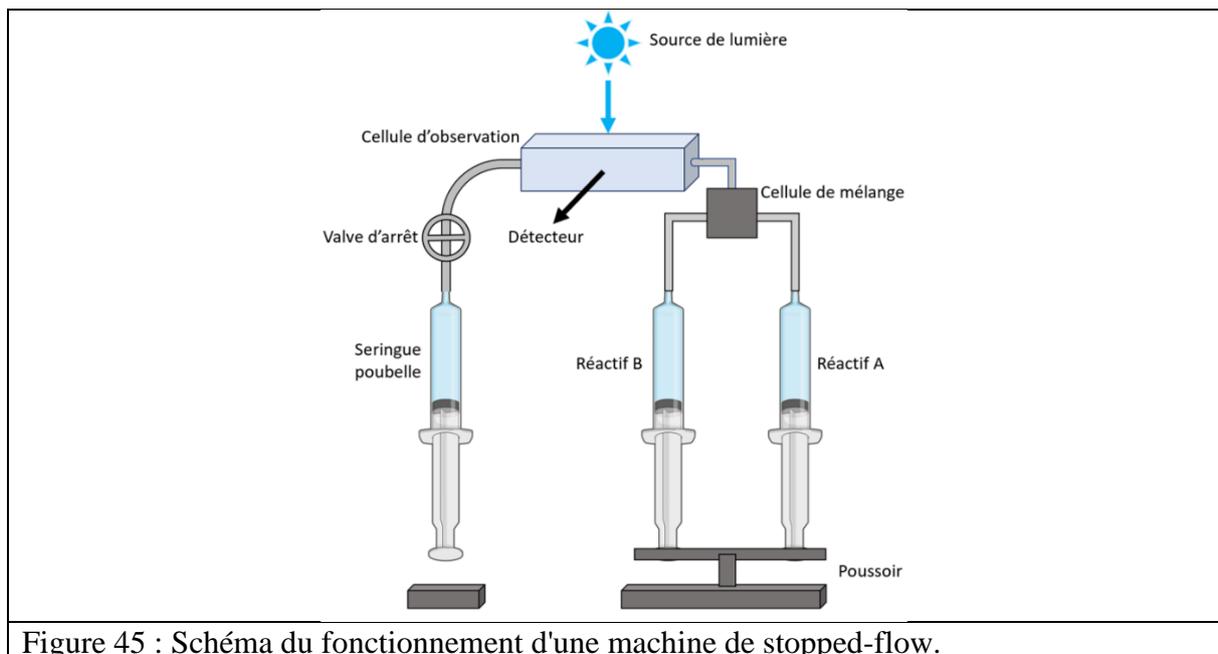


Figure 45 : Schéma du fonctionnement d'une machine de stopped-flow.

Plusieurs optimisations ont été faites au niveau des conditions expérimentales, notamment le choix des filtres d'émission pour n'avoir que le signal de fluorescence intrinsèque de BmrA. L'emploi d'un filtre interférentiel centré sur 330 nm a été utilisé. De plus, j'ai déterminé la gamme de concentration d'ATP qui permettaient d'avoir le même signal observé sur notre spectrofluorimètre, car il n'était pas possible de détecter des changements de fluorescence avec des concentrations d'ATP inférieures à 70 μM sur le stopped-flow. De même, la concentration d'ATP ne devait pas être au-dessus de 1 mM, car il y avait un effet de filtre interne (Figure 46). En effet, le plateau est vite atteint mais son niveau d'amplitude diminue avec des concentrations croissantes d'ATP, jusqu'à être proche du signal de base à partir de 5 mM. Ainsi, la gamme de concentration d'ATP testé sur les mutants et la protéine sauvage varie de 100 à 800 μM .

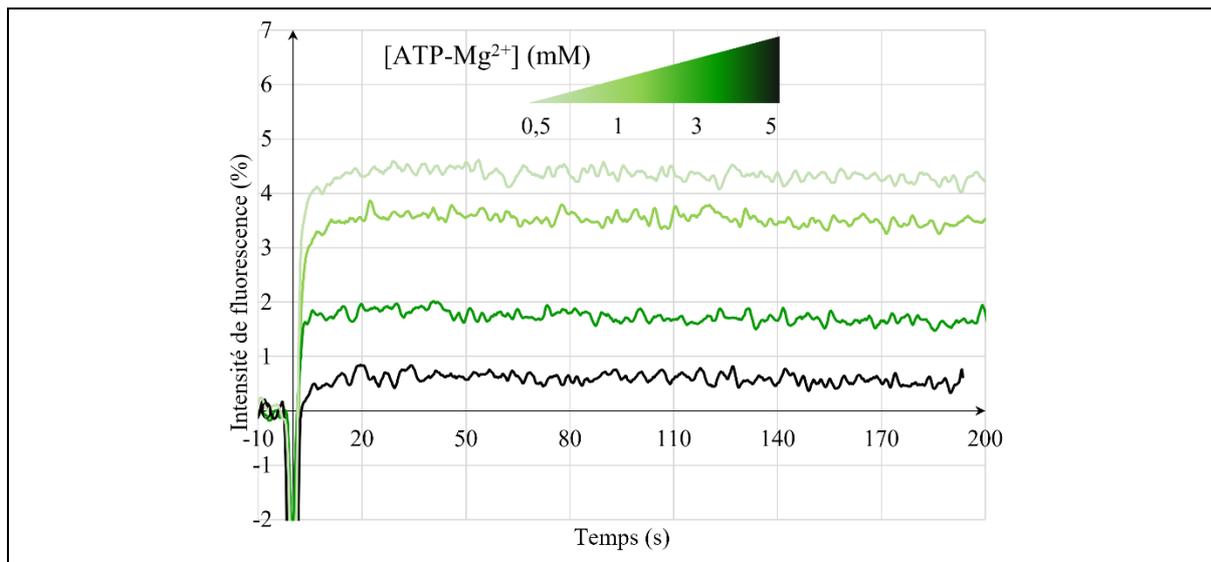


Figure 46 : Effet de filtre interne à des fortes concentrations d'ATP.

Ces mesures ont été réalisées sur BmrA-E504A en DDM-cholate en présence de R6G (50 μ M) sur le spectrofluorimètre SAFAS Xenius.

La mesure a été réalisée sur un temps de 60 s pour le mutant E504A car le changement de population est plus lent à température ambiante. Ce temps est de 10 s pour le mutant E504Q et la protéine sauvage (Figure 47). Avant chaque mesure, j'ai réglé les paramètres de voltage et le niveau de signal de fluorescence avec la protéine et le tampon, afin d'éviter une saturation du signal au moment d'ajouter l'ATP. On s'attend à une augmentation de fluorescence d'environ 10 % donc j'ai calibré le signal de base à 80 %. Par ailleurs, j'ai aussi vérifié s'il n'y avait aucun effet non spécifique lors du mélange entre la protéine et son tampon. Cette procédure a été réalisée pour chaque nouvelle espèce testée. C'est pourquoi, le niveau de fluorescence initiale change. Pour chaque concentration d'ATP, il était possible de réaliser 12 cinétiques indépendantes (une cinétique comporte 8192 points). Au moins 10 traces ont été gardées pour être moyennées. Les deux premières cinétiques étaient différentes car il fallait deux injections pour se débarrasser de la concentration précédente.

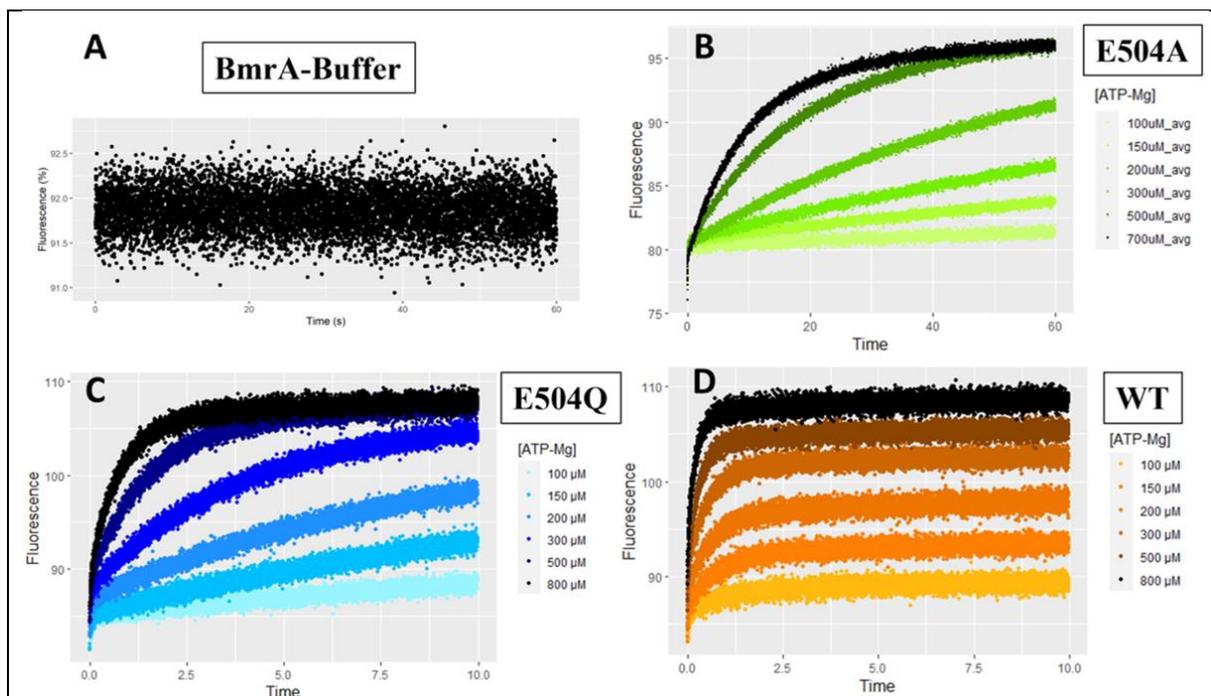


Figure 47 : Cinétiques des mutants E504A, E504Q, et la protéine sauvage (WT) avec une gamme de concentrations d'ATP.

Toutes les protéines ont été purifiées en DDM-cholate et préalablement incubé avec la R6G (50 μ M). Ces mesures ont été réalisées à 21 °C (thermostaté). Chacune des traces sont une moyenne de 10 traces indépendantes comportant 8192 points.

A/ Contrôle entre le tampon et BmrA en présence de R6G.

B/ Cinétiques de BmrA-E504A en fonction d'une gamme d'ATP (100 μ M (courbe vert clair) à 700 μ M (courbe noire)).

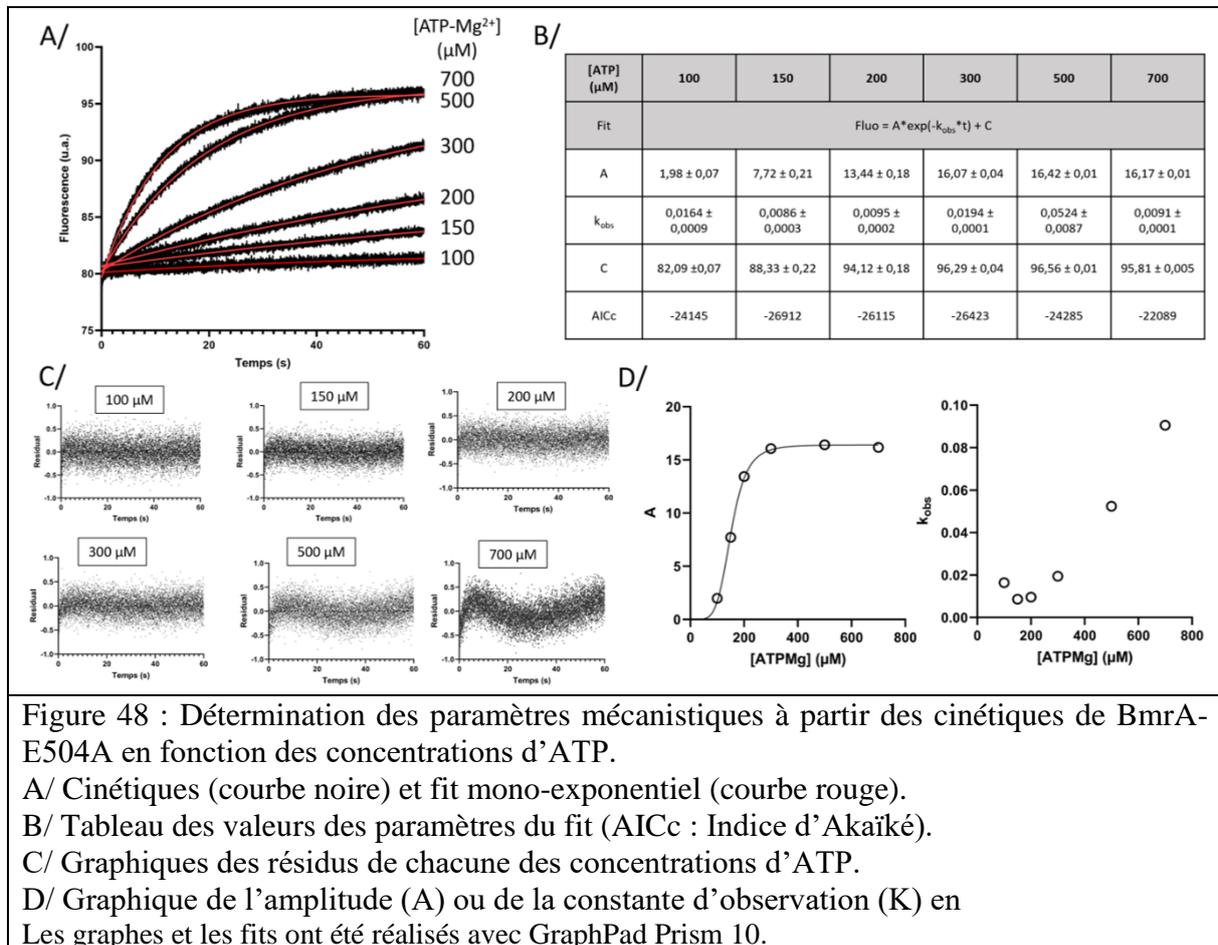
C/ Cinétiques de BmrA-E504Q en fonction d'une gamme d'ATP (100 μ M (courbe cyan) à 800 μ M (courbe noire)).

D/ Cinétiques de BmrA-WT en fonction d'une gamme d'ATP (100 μ M (courbe orangé) à 800 μ M (courbe noire)).

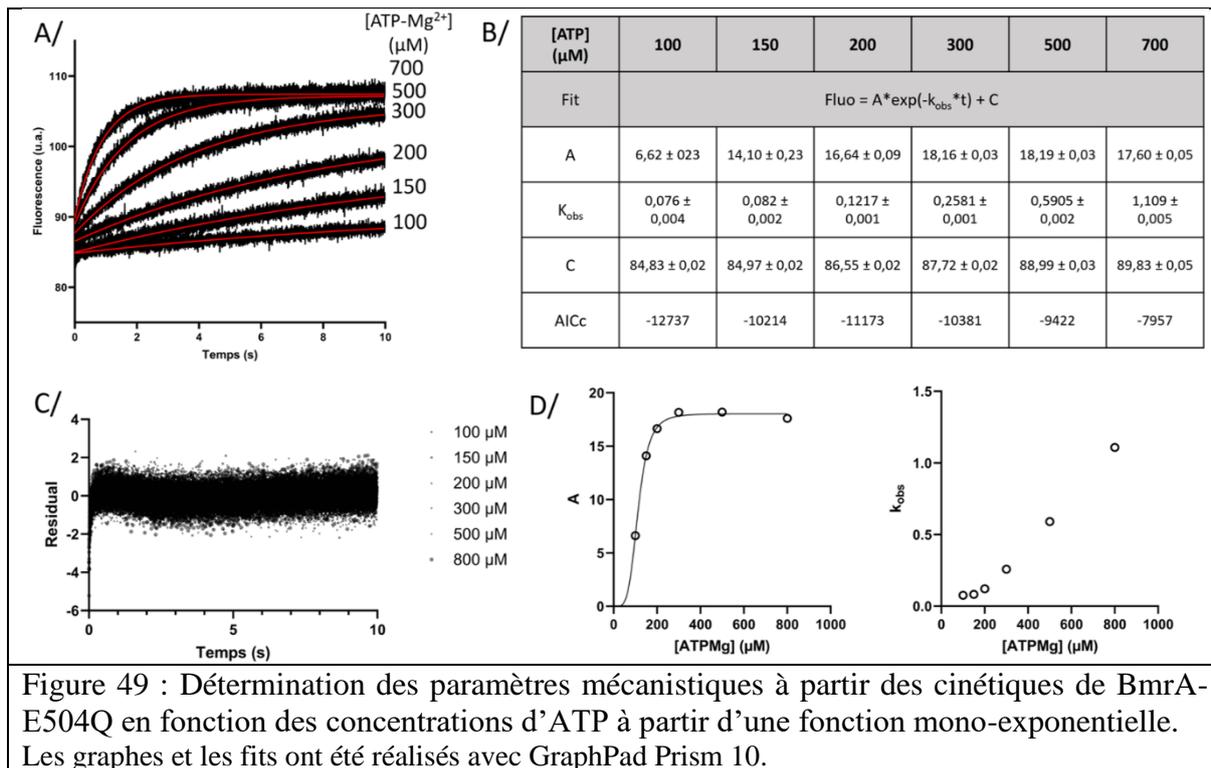
A partir de ces cinétiques, il est possible de déduire des informations sur le mécanisme à partir des paramètres comme l'amplitude ou la constante d'observation. Dans le cas du mutant E504A, j'ai modélisé les cinétiques par une fonction mono-exponentielle, avec l'équation : $Fluo = A \times \exp(-k_{obs} \times t)$, avec Fluo l'intensité de fluorescence, A l'amplitude entre le premier et dernier point, k_{obs} la constante d'observation, et t le temps (Figure 48). Afin de vérifier si le choix de cette équation est correct pour modéliser les cinétiques, j'ai réalisé le graphe résiduel pour chaque concentration d'ATP. Il représente la différence entre la donnée expérimentale et la donnée prédite par l'équation. Les points de ces graphes sont proches de l'origine et distribué de façon symétrique, à l'exception pour les concentrations d'ATP 500 et 700 μ M. J'ai testé aussi une fonction double exponentielle à la place, mais le fit et l'indice d'Akaïké était moins bons. Cet indice permet de discriminer les modèles en fonction du nombre de paramètres et le critère de parcimonie sur un grand nombre de valeurs.

Les paramètres de la courbe mono-exponentielle ont pu être déterminés et sont représentés dans le tableau ci-dessous. En faisant l'amplitude ou la constante d'observation en fonction de la concentration d'ATP, j'ai obtenu deux graphes. Le premier est une courbe sigmoïdale qui traduit la coopérativité de fixation des molécules d'ATP en présence de R6G, équivalente à celle montrée dans la partie 1. Le deuxième graphe est plus complexe à interpréter car cela

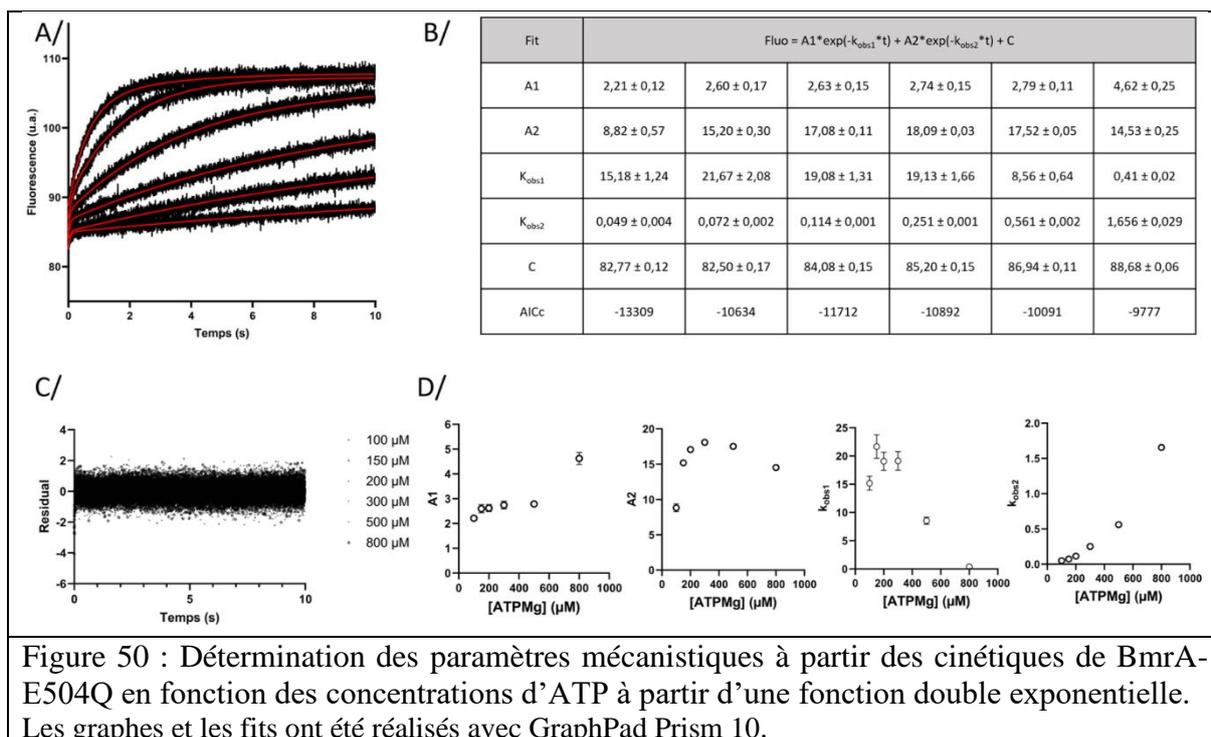
ressemble à une courbe en cloche inversée avec un k_{obs} minimal vers 150 μM . Une hypothèse serait qu'on observe deux phénomènes, à la fois la fixation de l'ATP et le changement de conformation.



Dans le cas du mutant E504Q, j'ai utilisé la même équation pour modéliser les données (Figure 49). Le graphe résiduel n'est pas symétrique au début ce qui signifie qu'il faut augmenter en ordre, c'est-à-dire utiliser une équation de double exponentielle. Toutefois, le graphe de l'amplitude représente une courbe sigmoïde (coopérativité de fixation d'ATP), et l'autre graphe montre que la constante d'observation augmente avec la concentration d'ATP ce qui est caractéristique d'un modèle de fixation dans deux conformations et un mécanisme d'« induced fit » (Chakrabarti et al. 2022). Par contre, la valeur de k_{off} serait proche de 0 car la fixation des molécules d'ATP est plutôt irréversible dans le sens où le changement de conformation se produit juste après.



Par ailleurs, j'ai aussi testé une équation en double exponentielle sur ces données du mutant E504Q (Figure 50). Le modèle est meilleur car le graphe résiduel est symétrique, proche de l'origine, et les indices d'Akaïké sont meilleurs (indice inférieur à ceux de la figure 49). Cela peut vouloir dire qu'on a deux phénomènes. Au niveau des paramètres, l'amplitude A1 semble être dépendante de la concentration d'ATP, mais l'amplitude A2 est une courbe en cloche avec un maximum vers 200 μM. On pourrait penser que l'amplitude 1 peut être associée à l'étape de changement de conformation qui est dépendant de la concentration d'ATP.



Dans le cas de la protéine sauvage, j'ai réalisé la même analyse avec les deux équations mono-exponentielle et double exponentielle (Figure 51). Le meilleur modèle est celui de l'équation double exponentielle, mais l'interprétation des paramètres est complexe et demande une étude plus approfondie. Au cours des 10 s, la protéine semble adopter une conformation OF en moins d'une seconde en atteignant directement un plateau qui dépend de la concentration d'ATP. Cependant, la protéine est capable d'hydrolyser l'ATP dans cette situation.

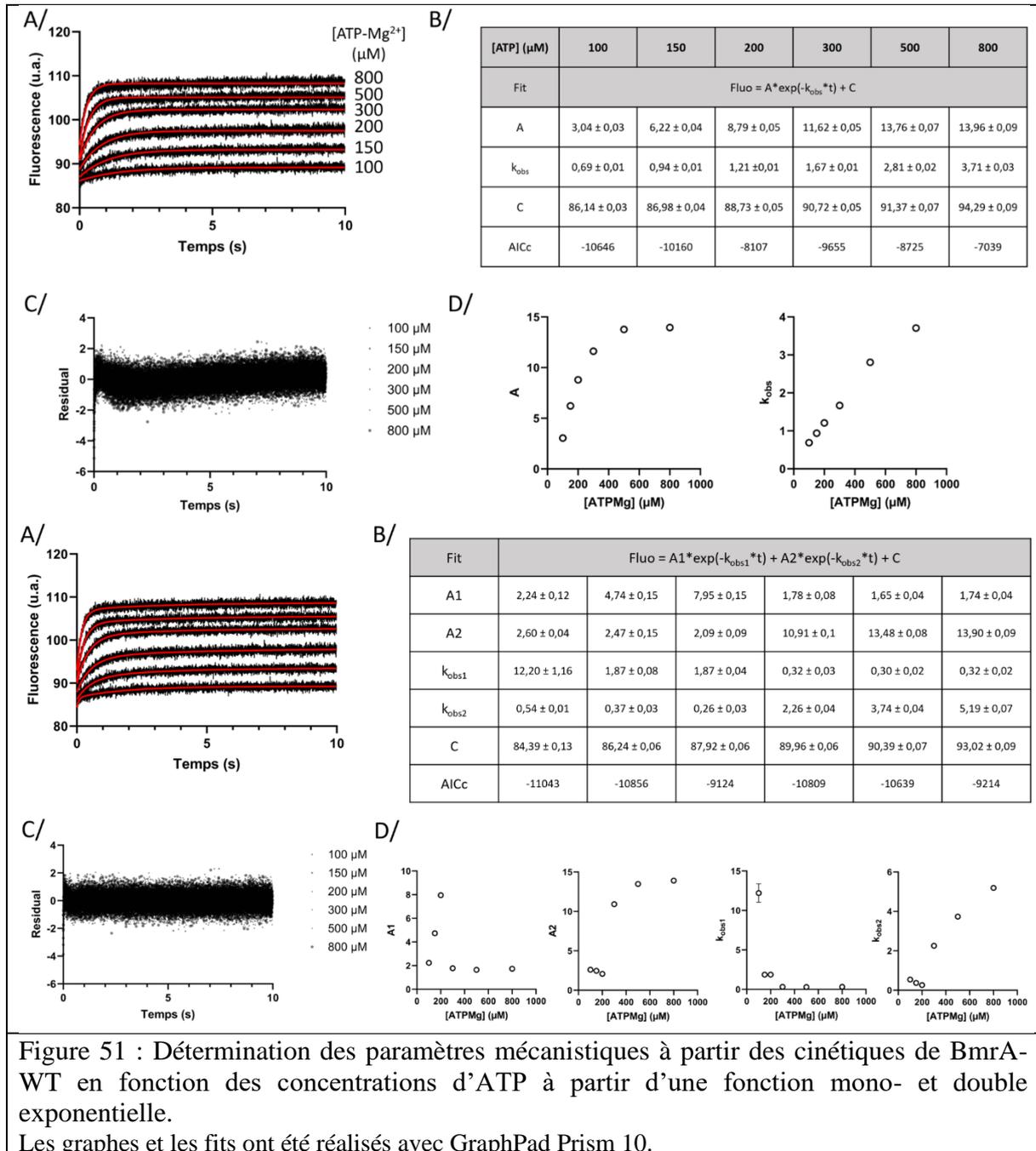


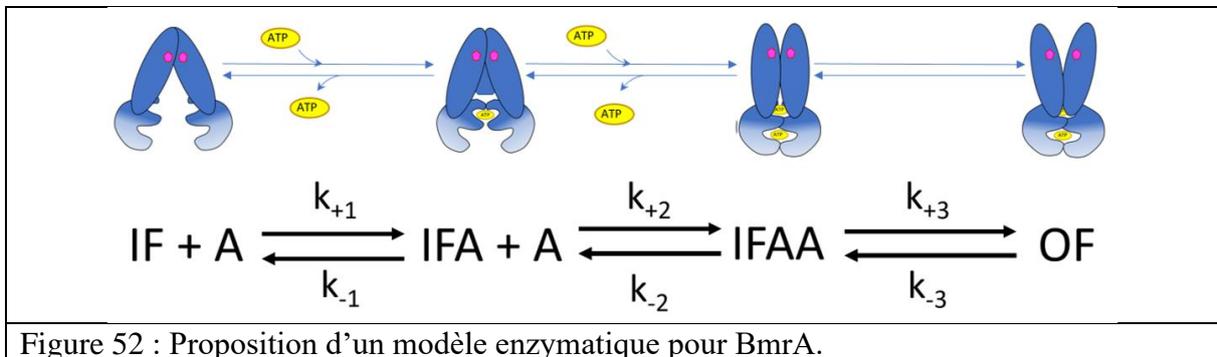
Figure 51 : Détermination des paramètres mécanistiques à partir des cinétiques de BmrA-WT en fonction des concentrations d'ATP à partir d'une fonction mono- et double exponentielle.

Les graphes et les fits ont été réalisés avec GraphPad Prism 10.

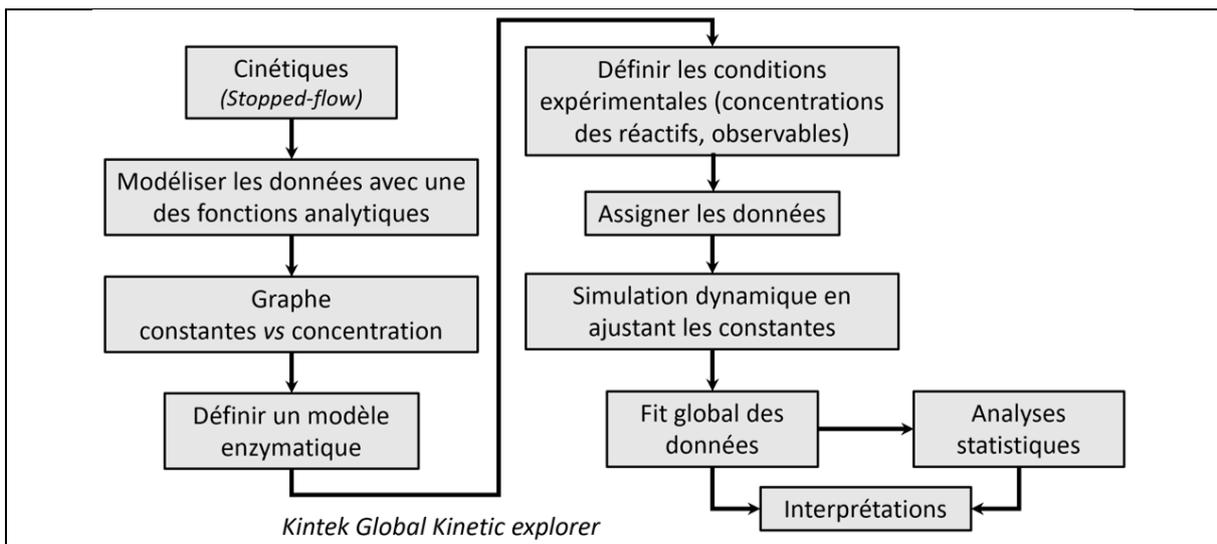
En résumé, BmrA fixe de façon coopérative deux molécules d'ATP, suivit d'un changement de conformation. Toutefois, la mutation sur la base catalytique impacte la vitesse de changement de population, ce qui pourrait impacter la fixation de la première molécule d'ATP (ralentissement) dans le site de fixation (NBS). Dans le cas de la protéine sauvage, le mécanisme étudié semble être complexe et nécessite d'autres investigations pour le décomposer. Par exemple, je pourrais suivre la cinétique de fluorescence de BmrA en fonction de la concentration d'ATP γ S, un analogue de l'ATP, qui ralentit le processus d'hydrolyse de l'ATP (Sauna et al. 2007).

4.4.3 Recherche d'un modèle enzymologique

A partir des analyses cinétiques préliminaires et des autres données de la partie 1, je propose ce schéma enzymatique qui comporte trois étapes, dont la fixation du premier ATP, la fixation du deuxième ATP, suivit du changement de conformation (Figure 52).



J'ai utilisé le logiciel « Kintek Global Kinetic explorer » pour vérifier si c'est le bon modèle, et déterminer les différentes constantes cinétiques. En effet, le logiciel va permettre de modéliser globalement sur l'ensemble des données expérimentales les équations calculées à partir du modèle enzymatique proposé. Cette procédure est résumée dans la figure 53.



J'ai mentionné les concentrations des réactifs, c'est-à-dire, la concentration de l'espèce IF à 0,5 μM car il y a deux sites pour l'ATP pour BmrA, et les concentrations d'ATP pour chaque cinétique. De plus, il faut aussi écrire la relation qui existe entre le signal de fluorescence et les différents espèces (IF, IFA, IFAA, OF), mentionné sous le nom d'observable. Plusieurs observables sont possibles car la somme de ces espèces peut contribuer en partie au signal. J'ai testé quatre observables qui sont :

- Obs 1 : $\text{Fluoi} + \text{Fluo1} \times \text{IFA} + \text{Fluo2} \times \text{IFAA} + \text{Fluo3} \times \text{OF}$, la fluorescence dépend de toutes les espèces sauf IF.
- Obs 2 : $\text{Fluoi} + \text{Fluo1} \times \text{IFA} + \text{Fluo2} \times (\text{IFAA} + \text{OF})$, la fluorescence des espèces IFAA et OF est similaire car la dimérisation des NBDs en présence de deux molécules d'ATP procurent le même environnement hydrophobe des résidus de tryptophane.
- Obs 3 : $\text{Fluoi} + \text{Fluo1} \times (\text{IFA} + \text{Fluo2} \times (\text{IFAA} + \text{OF}))$, la fluorescence ne dépend que des espèces IFAA et OF.
- Obs 4 : $\text{Fluoi} + \text{Fluo1} \times (\text{IFAA} + \text{Fluo2} \times \text{OF})$, la fluorescence ne dépend que de l'espèce OF.

(Fluoi : fluorescence initiale ; Fluo1/2/3 : facteurs d'échelle)

J'ai ajusté les paramètres pour que le logiciel modélise l'ensemble des données en fonction des caractéristiques du modèle. Les constantes ont été mises dans les tableaux ci-dessous pour les mutants inactifs et la protéine sauvage. Le paramètre χ^2 a été calculé pour déterminer le meilleur modèle. Ces modélisations doivent être encore affinées.

Dans le cas du mutant E504A (Tableau 7), le meilleur modèle est celui avec l'observable (Obs) n°3 (Tableau 5).

Observables	k_{+1}	k_{-1}	k_{+2}	k_{-2}	k_{+3}	k_{-3}
Obs 1 $\chi^2 = 14006$	$(27 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	104 ± 15	$2,26 \pm 0,08$	706 ± 117	$0,33 \pm 0,01$	$(0 \pm 2,5) \times 10^8$
Obs 2 $\chi^2 = 10726$	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	109 ± 11	$1,36 \pm 0,13$	573 ± 68	$2,35 \pm 0,22$	$(0 \pm 1,0) \times 10^9$
Obs 3 $\chi^2 = 10677$	$(17,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	173 ± 17	$0,097 \pm 0,004$	142 ± 17	$3,57 \pm 0,12$	$0 \pm \text{ND}$
Obs 4 $\chi^2 = 16546$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	624 ± 142	$0,75 \pm 0,03$	$3,66 \pm 0,94$	$0,30 \pm 0,01$	$(0 \pm 1,2) \times 10^8$

Tableau 5 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-E504A.

Dans le cas du mutant E504Q (Tableau 8), le meilleur modèle est aussi avec l'observable n°3 (Tableau 6).

Observables	k_{+1}	k_{-1}	k_{+2}	k_{-2}	k_{+3}	k_{-3}
Obs 1 $\chi^2 = 68678$	$(13 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	101 ± 46	$0,68 \pm 0,06$	60 ± 27	$2,07 \pm 0,13$	$0 \pm \text{ND}$
Obs 2 $\chi^2 = 63190$	$(4,2 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	621 ± 255	$10,43 \pm 0,97$	$46,9 \pm 20,9$	$1,75 \pm 0,09$	$0 \pm \text{ND}$
Obs 3 $\chi^2 = 52832$	$(6,4 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	500 ± 262	$8,04 \pm 0,36$	$74,48 \pm 39,50$	$1,74 \pm 0,03$	$(0 \pm 1,79) \times 10^{10}$
Obs 4 $\chi^2 = 71786$	$(15,4 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	348 ± 60	$1,07 \pm 0,10$	$99,4 \pm 17,6$	$5,51 \pm 0,33$	$(0 \pm 1,6) \times 10^8$

Tableau 6 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-E504Q.

Dans le cas de la protéine sauvage, j'ai testé deux modèles avec le même observable (Obs 3) (Tableau 7). Le premier modèle est le même que celui des mutants, alors que le deuxième présente une autre étape supplémentaire qui est l'hydrolyse de l'ATP et le retour de la conformation OF vers la conformation IF.

Observables	k_{+1}	k_{-1}	k_{+2}	k_{-2}	k_{+3}	k_{-3}	k_{+4}	k_{-4}
Modèle 1 $\chi^2 = 31152$	$(13 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	160 ± 112	$8,92 \pm 1,26$	$62,4 \pm 41,6$	$0,93 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,01$		
Modèle 2 $\chi^2 = 27771$	$0,044 \pm 0,005$	778 ± 407	$3,03 \pm 0,67$	$51,57 \pm 28,71$	$16,28 \pm 2,46$	$2,42 \pm 0,4$	$8,19 \pm 1,45$	$37,61 \pm 5,15$

Tableau 7 : Les constantes cinétiques calculées à partir la modélisation de toutes les cinétiques pour BmrA-WT.

Le critère de choix du meilleur modèle se fait en fonction du χ^2 , qui doit être le plus faible. En revanche, il ne prend pas en compte le nombre de paramètres des équations, donc il faut que je refasse ces fits en prenant en compte le critère d'Akaïkè (AICc). A partir du modèle enzymatique établi, la figure 54 réunie l'ensemble des constantes cinétiques pour chaque étape du modèle dans le cas des mutants inactifs (E504A, E504Q) et la protéine sauvage (WT). La première étape correspond à la fixation de la première molécule d'ATP avec un k_{+1} d'environ $10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ainsi, la formation de la première espèce IFA semble ne pas être favorable. Par contre, la fixation d'une deuxième molécule d'ATP favorise la formation de l'espèce IFAA dans le cas de E504Q et WT. Ceci est cohérent avec les résultats de la partie 1 où la présence

de R6G rend coopératif la fixation des molécules d'ATP. Ce n'est pourtant pas le cas pour E504A. En effet, la perte d'hydrophilicité/charge du résidu de glutamate/glutamine doit influencer la fixation de l'ATP.

Pour l'étape de changement de conformation de l'espèce IFAA à l'espèce OF, les deux mutants possèdent une constante de sens inverse égale à 0, contrairement à celle du WT. Les molécules d'ATP fixées piègent la protéine dans la conformation OF car les mutations ne permettent plus de catalyser l'hydrolyse de l'ATP.

Enfin, l'étape d'hydrolyse de l'ATP, le retour de la conformation OF vers la conformation IF avec la libération des produits, est deux fois moins rapide que la transition IF vers OF. La valeur des constantes de ce modèle ne représente pas forcément la réalité car le modèle est basé sur les données de cinétique de 10 s. Cependant, les données sur 200 s montrent un profil cinétique en deux parties avec une phase très rapide (changement de conformation) et une autre plus lente (consommation de l'ATP et relaxation dans la conformation IF). Ainsi, d'autres données doivent être collectées sur la protéine sauvage pour améliorer le modèle.

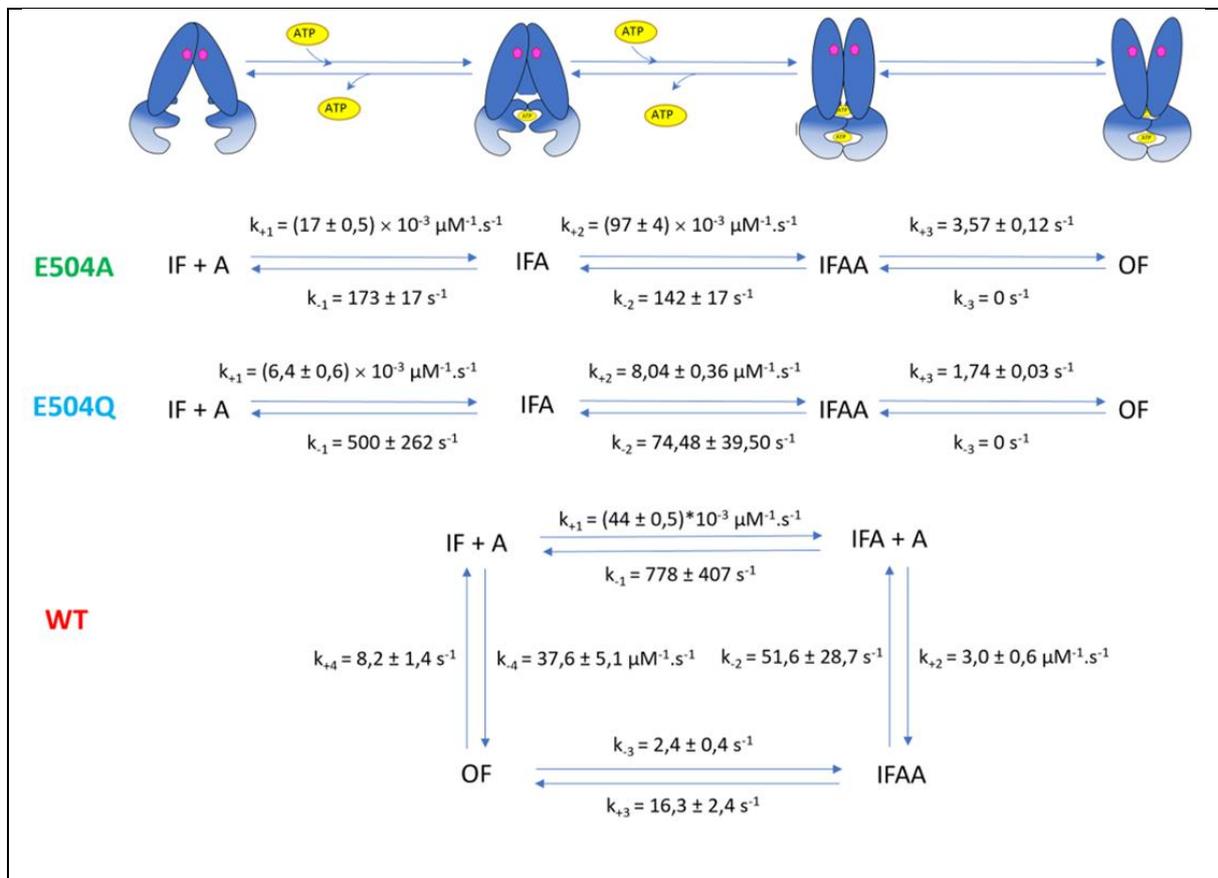


Figure 54 : Modèles enzymatiques des mutants (E504A, E504Q) et de la protéine sauvage à partir des données cinétiques.

4.4.4 Acquisition et analyse des données structurales par cryoEM en temps résolu

A partir des conditions choisies, nous avons préparé des grilles cryoEM avec le mutant E504A en DDM-cholate ($25 \mu\text{M}$) en présence de R6G ($50 \mu\text{M}$), incubé avec de l'ATP-Mg²⁺ ($300 \mu\text{M}$). Ces conditions nous permettent de ralentir le changement de population de la conformation IF vers OF. Le but est d'être dans les mêmes conditions que les tests de biochimie. Ainsi, BmrA est préalablement incubé avec la R6G dans un tube eppendorf placé sur un portoir artisanal dans le vitrobot, puis la réaction est enclenchée par l'ajout et le mélange de l'ATP avec une micropipette avant d'être déposé sur grille (Figure 55).

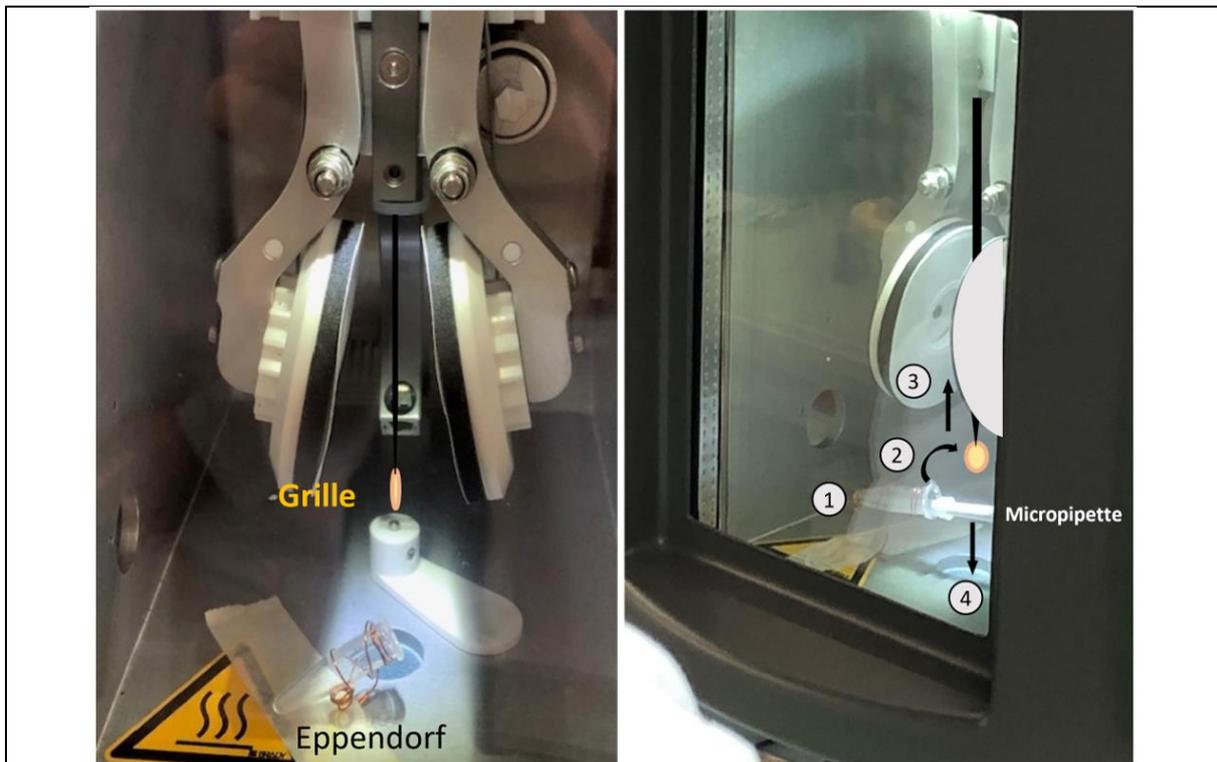


Figure 55 : Dispositif mise en place pour la cryoEM en temps résolu.

Photo de l'intérieur d'un vitrobot pour la préparation des grilles.

La procédure pour réaliser les grilles en temps résolu : (1) Initiation de la réaction en mélangeant BmrA-R6G (eppendorf) avec l'ATP (micropipette) ; (2) Dépôt du mélange sur la grille ; (3) Etape de blotting ; (4) Etape plonge-freezing.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Guy Schoehn, Dr. Leftheris Zarkadas a préparé les grilles avec différents temps qui sont 12 s, 20 s, et 40 s. Ce temps correspond au temps de mélange entre BmrA en présence de R6G et l'ATP, le dépôt sur la grille, le « blotting », puis le « plonge-freezing ». Il n'a pas été possible de descendre en dessous de 10 s avec cette procédure. Il est important de rappeler que le mélange manuel des composés est similaire à celui réalisé dans les expériences biochimiques pour avoir une corrélation entre les données. Ces trois grilles ont été réalisées en duplicat pour pouvoir sélectionner la meilleure grille avec la meilleure glace. Ces grilles ont été préparées le même jour avec la même protéine purifiée pour limiter le plus possible des variations inter-expérimentales. Enfin, les paramètres comme le choix du type de grilles, les paramètres d'hydrophilisation des grilles, et les paramètres du Vitrobot sont les mêmes que ceux de l'étude de la partie 1.

Les jeux de données 12 s et 40 s ont été collecté sur le Krios CM01 à Grenoble, alors que le jeu de données 20 s a été collecté avec le Glacios.

Une fois les données acquises, j'ai commencé à les traiter à l'aide du logiciel cryoSPARC. Les figure 56, 57, et 58 montrent la procédure employée pour traiter les données. Tout d'abord, les particules sur grille ont été sélectionnées automatiquement (blob picker) ou manuellement, ce qui donne des milliers et millions de particules sur l'ensemble des films (« movies »). Ensuite, une série de classification 2D est effectuée pour atténuer le bruit de fond et sélectionner des classes d'objets plus ou moins identifiables, sans être trop strict dans le choix des classes et ne pas exclure de potentielle classe utilisable. A partir de ces particules sélectionnées, les modèles 3D *ab initio* ont été générés pour chaque conditions expérimentales (12, 20, et 40 s).

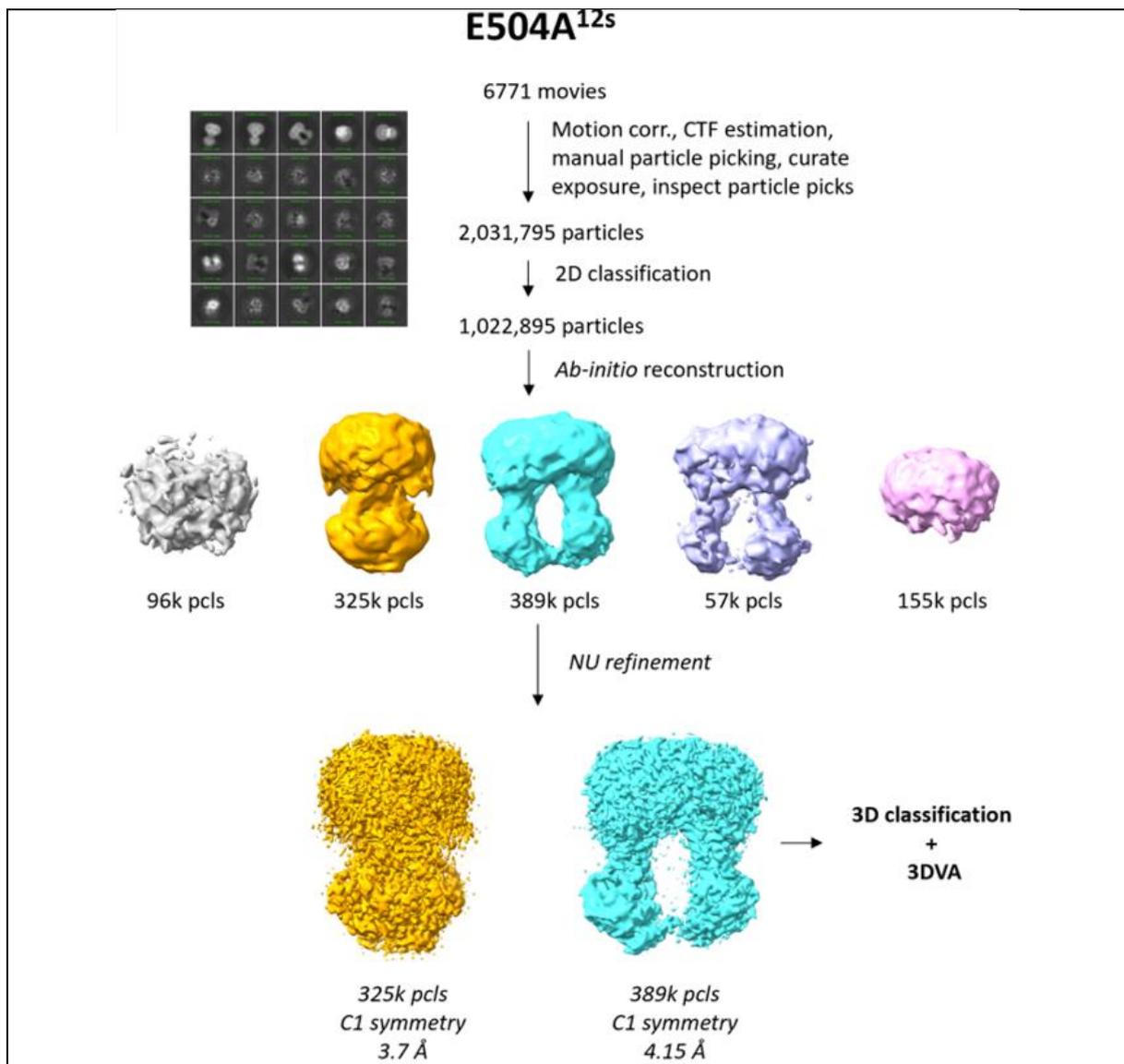


Figure 56 : Traitement des données de la collecte du mutant E504A à 12 s.

J'ai effectué un « blob picker » manuel car j'ai obtenu plein de classes 2D sous forme d'halo, où il n'est pas possible d'identifier BmrA, à la suite d'un « blob picker » automatique. En réalisant un « inspect pick », le logiciel a sélectionné de nombreux blob sur l'or de la grille et sur des contaminants de glace. La classification 3D et le 3DVA a été réalisé sur la conformation IF.

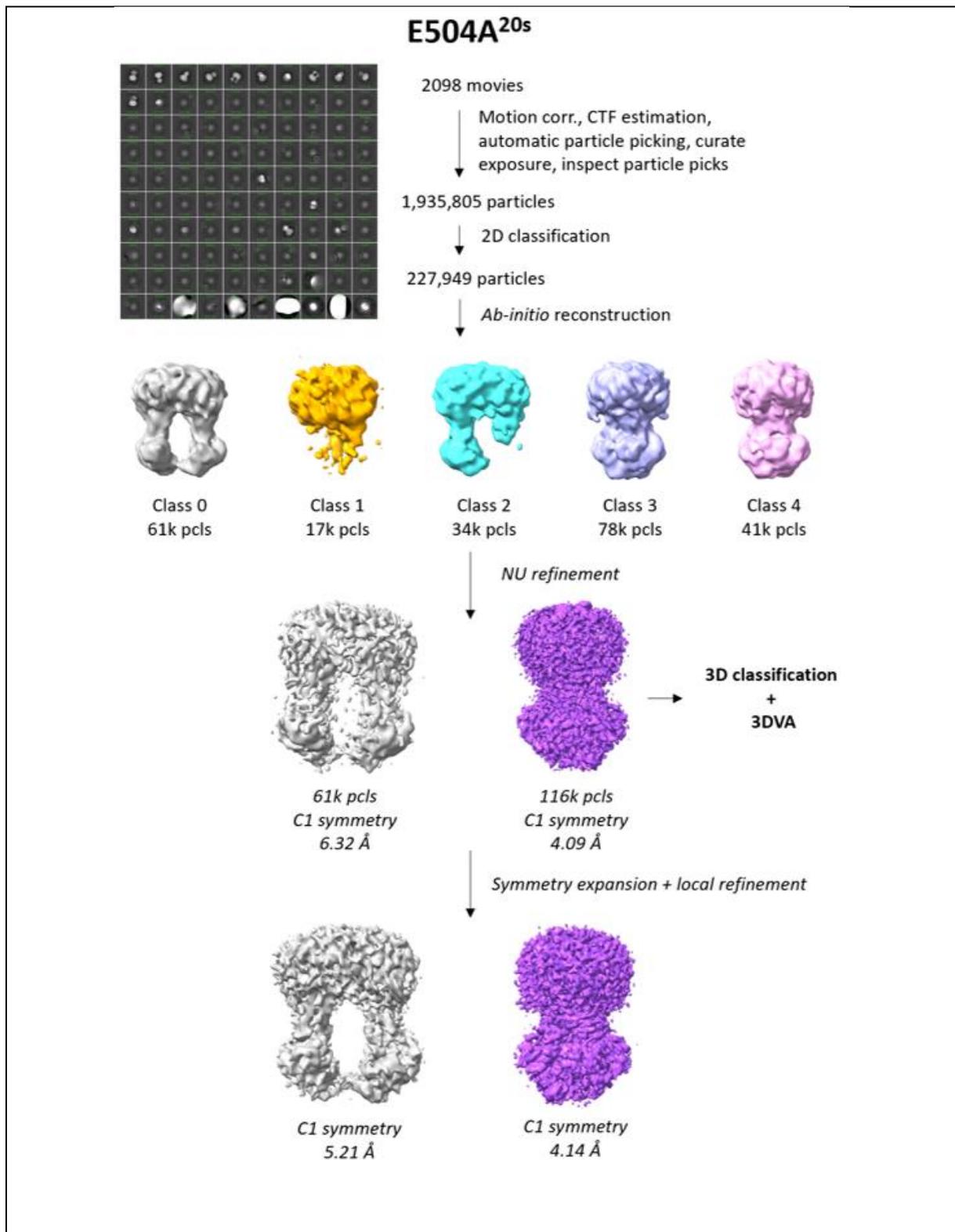
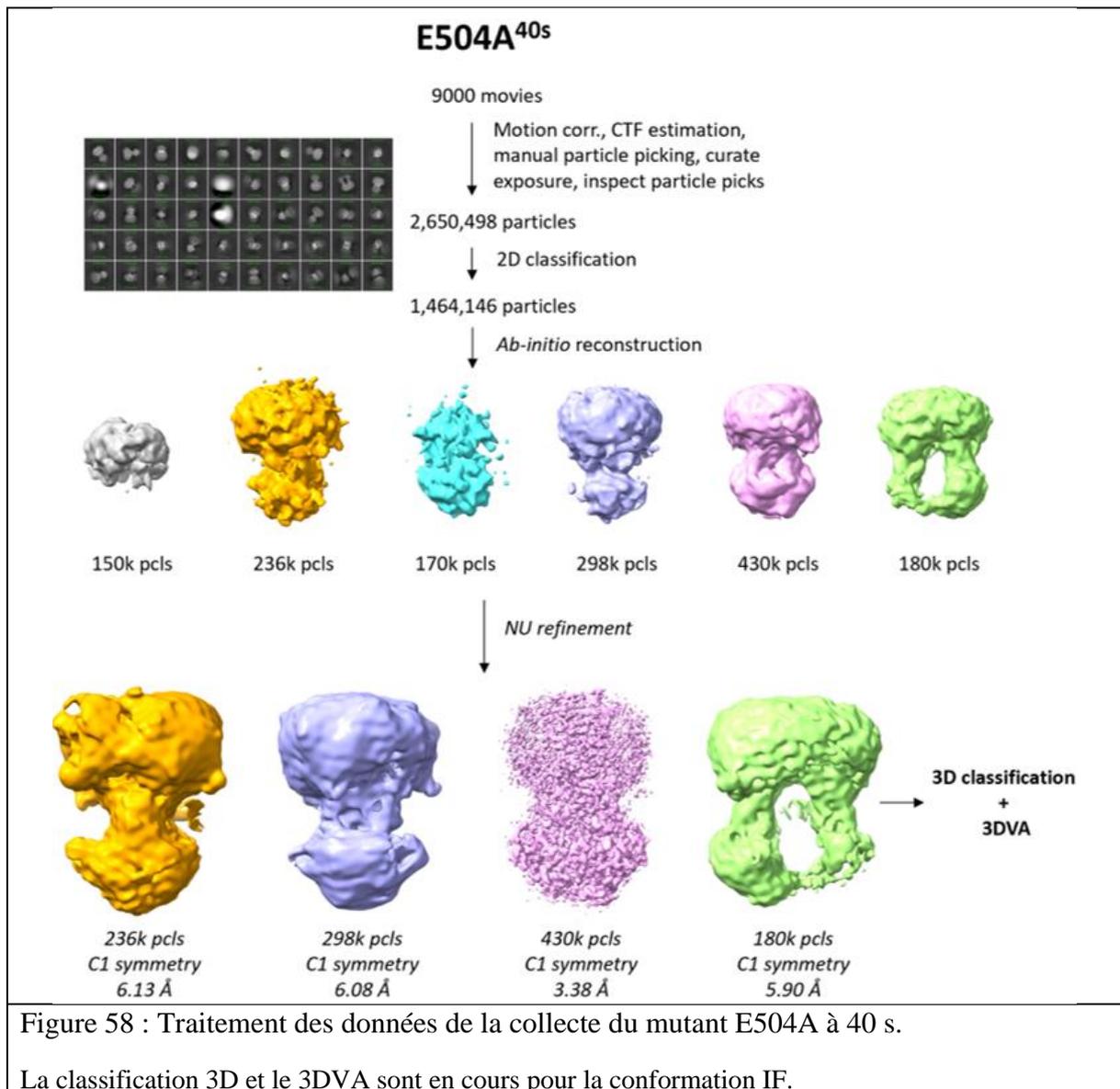


Figure 57 : Traitement des données de la collecte du mutant E504A à 20 s. La conformation OF a été affinée à partir des particules des classes 3 et 4. La conformation IF a été affinée à partir des particules de la classe 0. La classification 3D et le 3DVA de la conformation IF sont en cours de traitement.



Parmi ces modèles 3D *ab initio*, les conformations IF et OF de BmrA étaient identifiables dans des proportions de particules variables en fonction du temps. Le pourcentage entre chaque conformation (Tableau 8) a été calculé en faisant le rapport entre le nombre de particules d'une conformation sur le total de particules associées aux deux conformations (IF et OF). Par exemple pour 12 s, il y a 780 461 particules totales pour les deux conformations, et 242 434 particules qui appartiennent à une classe « poubelle ». La classe 1 représente un modèle de BmrA dans la conformation OF avec 325 252 particules, alors que les classes 2 et 3 sont similaires à une conformation IF avec un total de 455 209 particules, soit 42 % de particules en conformation OF et 58 % de particules en conformation IF. Le pourcentage de particules en conformation IF diminue au cours du temps alors que celui en conformation OF augmente jusqu'à 77 % après 40 s d'incubation entre BmrA et l'ATP.

Temps (s)	Conformation IF (%)	Conformation OF (%)	Total (Conformations)	Autres (%) *	Total (particules)
12 s	58	42	771 461	24	1 022 895
20 s	45	55	211 321	7	227 949
40 s	23	77	1 143 583	32	1 464 146

Tableau 8 : Pourcentages des conformations IF et OF sélectionnées sur les grilles en fonction du temps.

Pour 12 s : conformation IF (Classes 2 et 3), conformation OF (Classe 1), et autres (Classes 0 et 4).

Pour 20 s : conformation IF (Classes 0 et 2), conformation OF (Classes 3 et 4), et autres (Classe 1).

Pour 40 s : conformation IF (Classe 5), conformation OF (Classes 1, 3 et 4), et autres (Classes 0 et 2).

*Ce pourcentage est calculé en faisant le rapport entre le nombre de particules issues de classes où BmrA n'est pas identifiable sur le nombre total de particules sélectionnées pour les modèles 3D *ab initio*. Par exemple, pour 12 s, les classes 0 et 4 représentent 95 995 particules et 155 439 particules, respectivement, et le total de particules est de 1 022 895, soit 24 % de particules ne sont probablement pas BmrA.

Chacun des modèles a été affiné par un « non-uniform refinement ». Certains modèles *ab initio* se rapprochent des conformations IF et OF mais ils ont une résolution de 6 Å ce qui ne permet pas d'avoir une structure à haute résolution. La qualité, le nombre, et l'hétérogénéité de ces particules ne permettent donc pas d'acquérir une meilleure résolution, afin de vérifier si ce sont des intermédiaires entre les conformations IF et OF.

Le traitement de ces données n'est pas fini. Je suis en train d'affiner l'ensemble des structures des trois jeux de données à l'aide d'une « symmetry expansion » et un « local refinement » pour acquérir des structures 3D à haute résolution et les modéliser avec le logiciel Coot.

L'intérêt d'utiliser le temps en cryoEM est la possibilité d'augmenter le nombre de particules des états intermédiaires. En fonction du système étudié, il est possible d'obtenir ces intermédiaires à partir des modèles 3D *ab initio*, sinon il est nécessaire d'effectuer des analyses plus poussées sur l'hétérogénéité des particules grâce à une classification 3D, 3DVA, ou encore 3DFlex (ou autres logiciels similaires). Dans le cas de BmrA, il y a des classes dans des conformations IF ou OF. Cependant, il est difficile de distinguer des différences entre ces modèles sans affinement ou avec une mauvaise résolution. C'est pourquoi, j'ai réalisé une classification 3D qui permet d'analyser l'hétérogénéité discrète au sein des particules d'une classe avec la conformation IF du jeu 12 s. Dix classes ont été générées à 6 Å de résolution (Figure 59). Les classes 1 et 4 présentent une ouverture du transporteur légèrement différente. J'ai donc regroupé en deux parties les particules ressemblant à la classe 1 ou 4, puis j'ai affiné par un « non-uniform refinement » en gardant les volumes des classes 1 et 4. Deux structures 3D avec une résolution de 4,39 Å et 4,46 Å en C1 ont été obtenues avec une ouverture assez distincte.

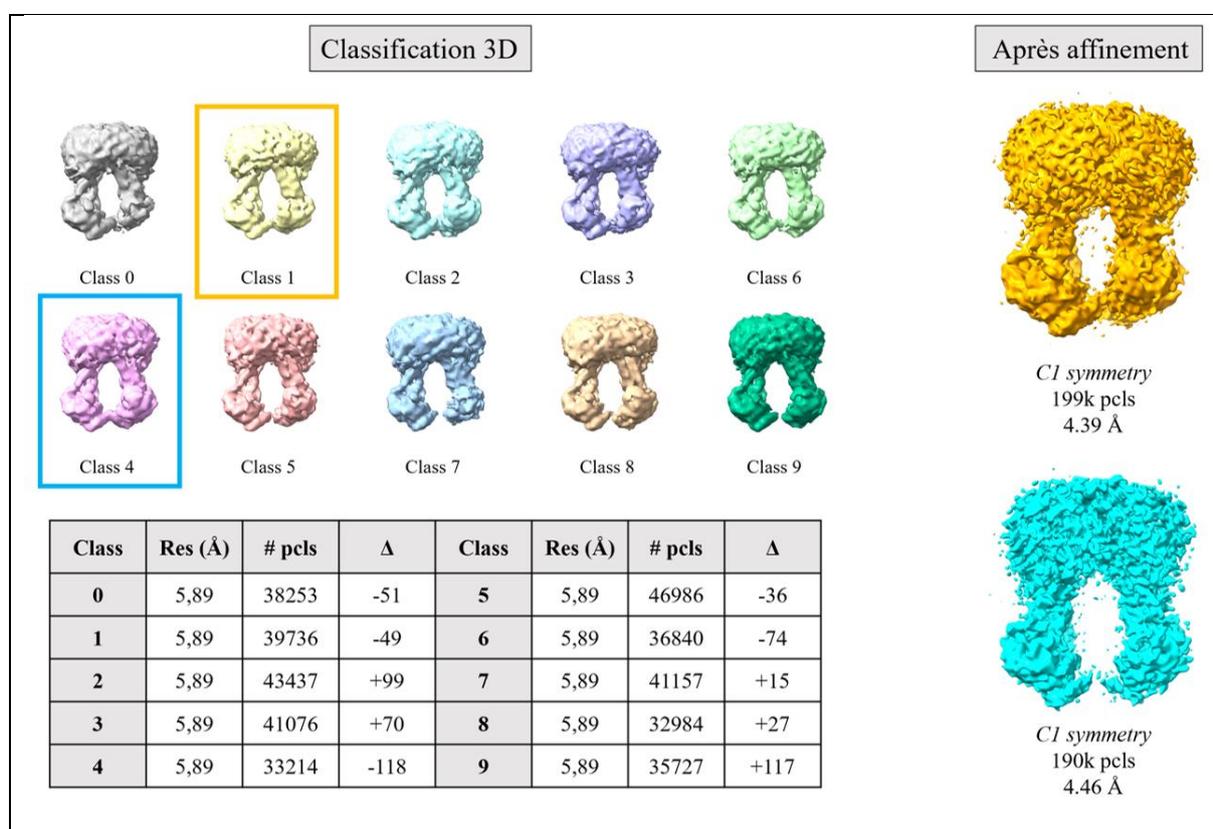


Figure 59 : Classification 3D et structures 3D de BmrA de deux intermédiaires conformationnels de la conformation IF à partir du jeu 12s.

La structure 3D affinée (structure jaune) a été obtenue en prenant le volume de la classe 1, avec les particules des classes 0,1,2,3, et 6.

La structure 3D affinée (structure cyan) a été obtenue en prenant le volume de la classe 4, avec les particules des classes 4,5,7,8, et 9.

L'affinement a été réalisé avec le job « non-uniform refinement ».

J'ai poursuivi l'analyse de ce jeu de données en réalisant une analyse de la variabilité des particules, pour visualiser le paysage conformationnel de BmrA. Le résultat est le même que la classification 3D, mais l'outil 3DVA va calculer les variances inter-particules en les classant par composante principale selon une trajectoire linéaire. Ainsi, il va permettre de visualiser le

changement de la densité entre ces deux états extrêmes. Pour cela, cet outil a généré 20 cartes avec 4 modes principaux d'une résolution de 4,5 Å (Figure 60). La distribution des particules est gaussienne. Avec la composante 0, la vidéo nous montre la densité d'un NBD se rapprochant du deuxième NBD selon un mouvement de translation et de rotation. Cette analyse est en cours, et doit être faite sur les 3 autres composantes. L'objectif de ces études est d'analyser cette variabilité sur l'ensemble des jeux de données pour visualiser la dynamique expérimentale, et de réaliser leurs *varref*, une fois que leurs modèles seront finalisés afin de mieux analyser les mouvements.

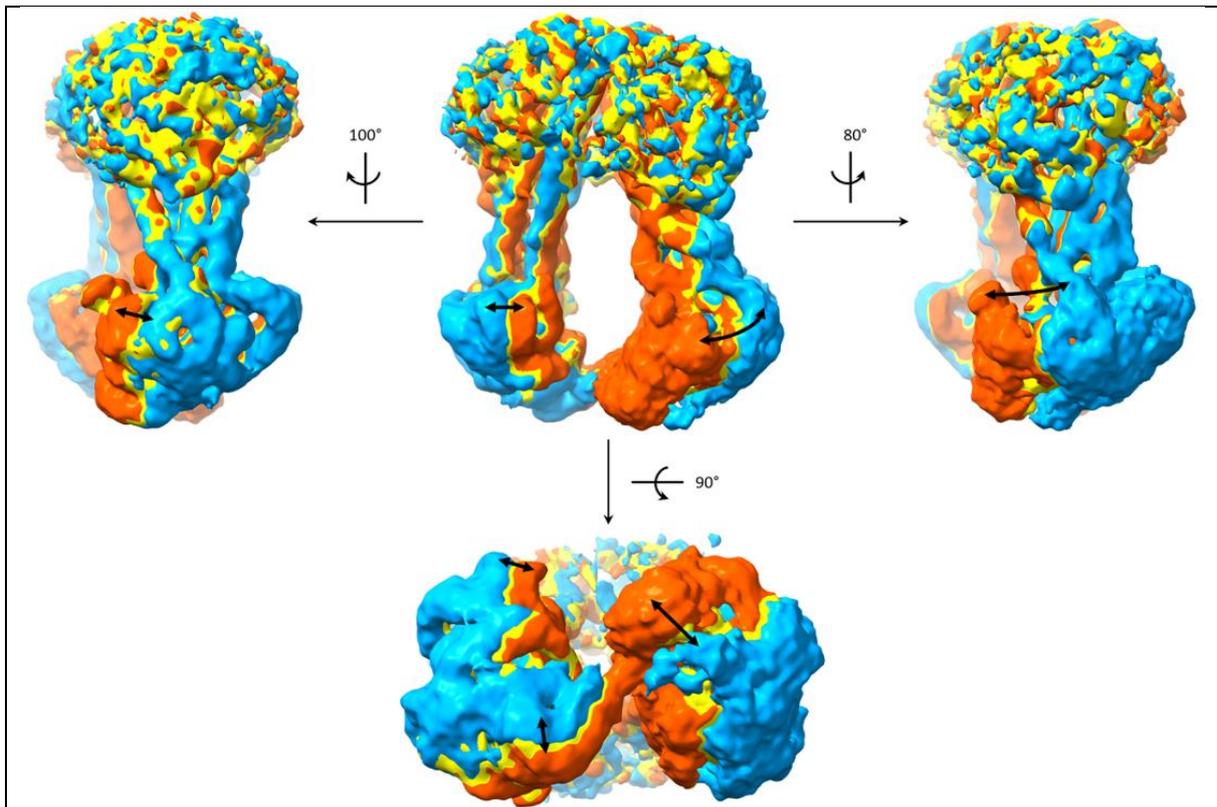


Figure 60 : Cartes issues du 3DVA pour la composante 0 du jeu E504A-12s. Les cartes extrêmes du continuum ont été colorées en bleu et orange, et la carte jaune est un intermédiaire entre les deux.

En résumé, la cryoEM en temps résolu sur le mutant inactif E504A a permis d'acquérir de nombreuses structures à des temps différents. Un changement de population entre la conformation IF vers OF en présence d'ATP a été caractérisé grâce à la fluorescence intrinsèque de BmrA. Les pourcentages de population en conformation IF et OF changent au cours du temps, et semblent suivre la cinétique de fluorescence. L'hypothèse du changement de fluorescence lié à l'évolution de la population de la conformation OF est consolidée par ces données structurales. Le fait que les conditions expérimentales soient identiques entre la partie biochimie et structurale renforce cette corrélation (Figure 61). Par ailleurs, il a été possible d'obtenir des intermédiaires locaux des états stables (IF et OF), avec la visualisation de la pré-fermeture des NBDs et l'obtention d'un nouvel intermédiaire OF qui présente l'hélice TM1 qui contraint la sortie de la R6G (résultats non montrés). Toutefois, l'analyse de la variabilité inter-particule nous permet d'avoir la dynamique expérimentale de BmrA. Il me reste à finaliser ces analyses sur l'ensemble des jeux de données (12, 20, et 40 s) afin d'avoir une vision globale sur les changements qui se produit au cours de cette transition. Un point important concerne l'erreur sur la mesure de fluorescence et la procédure d'analyse des particules sur grille. En effet, le nombre de particules présentes sur la grille, et sélectionnées pour les modèles 3D *ab initio*, doit être analysé de façon statistique afin de standardiser la procédure. Ceci a été mentionné dans la référence suivante comme une limite de cette technique (S. Bhattacharjee et al. 2024).

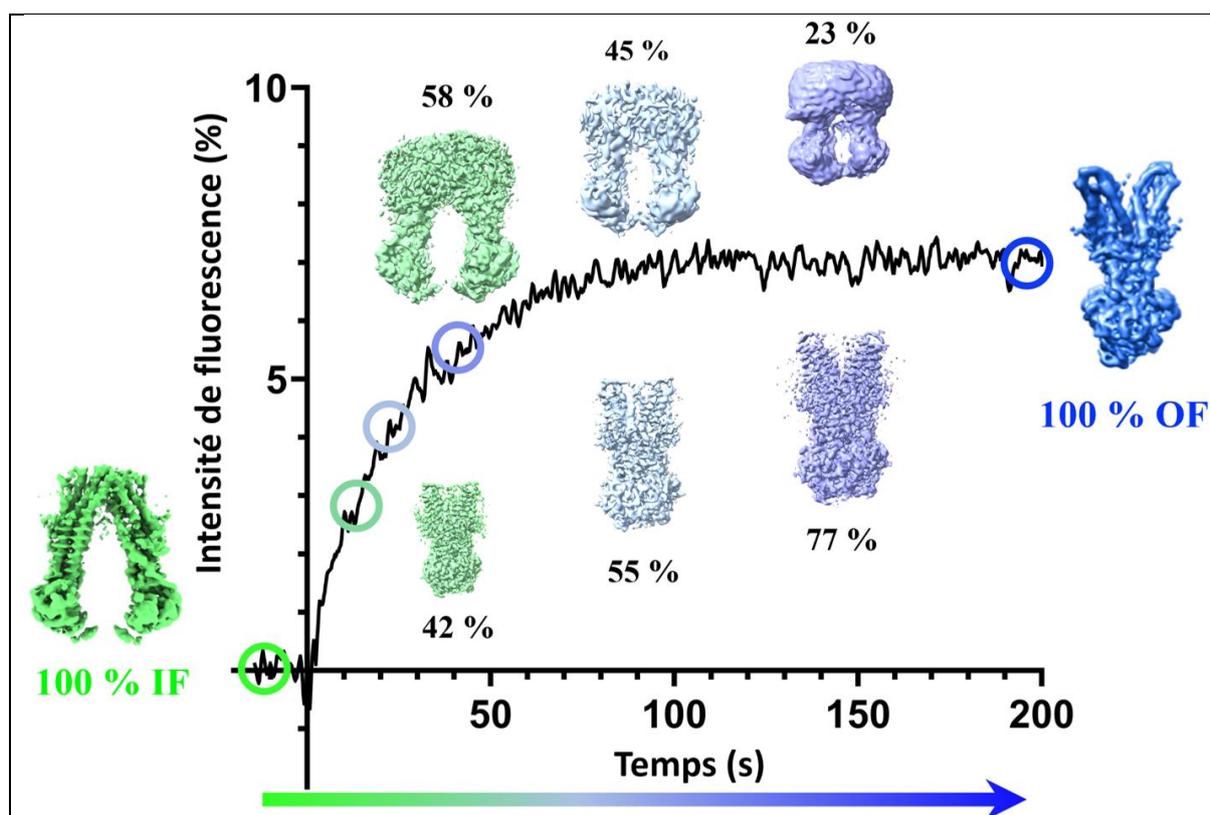


Figure 61 : Corrélation entre la fluorescence et les données cryoEM sur la transition de la conformation IF vers la conformation OF du mutant E504A en présence de R6G et d'ATP. La courbe de fluorescence a été réalisée avec le mutant E504A en DDM-cholate en présence de R6G (50 μ M) après l'ajout d'ATP (300 μ M) à 21 °C. Les structures IF et OF (100 %) sont issues de la partie 1.

4.5 Conclusions et perspectives

L'étude de la dynamique des protéines est primordiale pour mieux appréhender la relation structure-fonction des différents processus biochimiques. Effectivement, ces processus sont la conséquence de divers mouvements au sein de la protéine en réponse à des signaux physico-chimiques extérieurs. Diverses technologies permettent d'identifier et de visualiser ces mouvements en utilisant le temps comme un paramètre expérimental. Le but de ces investigations est de pouvoir déterminer avec précision la chronologie relative des différentes étapes du mécanisme de la protéine, c'est-à-dire caractériser les mouvements de structures secondaires voire de domaines en fonction d'une échelle de temps.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des techniques d'enzymologie et la cryoEM en temps résolu pour étudier la personnalité de BmrA en détergent. La cryoEM permet à la fois d'acquérir une structure 3D à haute résolution des conformations stables mais aussi à recueillir des informations dynamiques grâce à l'analyse de l'hétérogénéité des particules. De nombreuses techniques en temps résolu ont été développées dans ce domaine en gagnant en résolution temporelle, allant de la seconde jusqu'à la microseconde. Avant d'effectuer ce type d'étude structural, il faut bien caractériser biochimiquement l'échantillon, notamment déterminer les mêmes conditions expérimentales pour avoir une bonne corrélation entre l'aspect enzymatique et structurale. Dans le cas de BmrA, je me suis intéressé à la caractérisation de la transition entre la conformation IF et OF à l'aide du mutant inactif E504A. Pour cela, je me suis servi de sa fluorescence intrinsèque pour suivre le changement de conformation après l'ajout d'ATP. Ceci a été réalisé en présence de R6G, un effecteur allostérique, car l'intensité du signal de fluorescence était trop faible en l'absence de ce ligand. En effet, l'intensité maximale du plateau est d'environ 2 % après l'ajout d'ATP. Une caractérisation d'un autre mutant inactif E504Q et de la protéine sauvage ont aussi été faites dans ces conditions, montrant des profils cinétiques bien distincts. Le mélange des composés était manuel pour enclencher la réaction, et le suivi de la fluorescence a été réalisé avec un spectrofluorimètre qui ne permettait pas d'avoir accès aux premières secondes de cinétique. C'est pourquoi, j'ai utilisé un stopped-flow qui m'a permis de commencer à acquérir des paramètres cinétiques sur BmrA en établissant un premier modèle enzymatique. Ces premières informations sont uniques car très peu d'études ont été faites sur la cinétique des transporteurs ABC, en particulier chez les exportateurs de type IV. Cependant, les valeurs des constantes cinétiques calculées doivent être pertinentes d'un point de vue mécanistique pour BmrA.

D'après les résultats de cinétique, le mutant E504A était plus lent dans le changement de population entre la conformation IF et OF, comparé à l'autre mutant E504Q. Cette différence est dû à la nature du résidu muté qui impacte la fixation de l'ATP jouant sur la vitesse de dimérisation des NBDs. Ceci a été montré avec MRP1 avec une durée de vie de la conformation IF légèrement plus longue dans le cas du mutant E1454Q (7,7 s) vis-à-vis du WT (4,7 s) (Wang et al. 2020). Pour renforcer ces résultats, je vais réaliser d'autres expériences sur le mutant K380A, connu pour empêcher la dimérisation des NBDs. Par ailleurs, la protéine sauvage a aussi apportée des informations complémentaires sur l'impact des mutants et l'étape d'hydrolyse de l'ATP. La nature biphasique de la courbe du WT interroge sur la diminution lente de fluorescence qui apparaît après quelques secondes. Une expérience de quench flow pourrait être utile pour suivre la formation des produits de réaction (ADP, Pi) et la consommation de l'ATP au cours du temps. Un autre moyen d'investigation sur le WT serait d'utiliser des analogues d'ATP non hydrolysable pour voir si on peut retrouver des profils

cinétiques similaires à ceux des mutants. Un autre point important serait aussi de réaliser des analyses statistiques sur les modèles enzymatiques obtenus afin de vérifier leurs qualités.

Par ailleurs, j'ai aussi testé d'autres ligands (H33342, doxorubicine, vincristine, vinblastine) que la R6G pour voir leur impact sur le changement de conformation dans le cas du mutant E504A en détergent. Ces résultats n'ont pas été montrés car ils doivent être reproduits mais j'ai obtenu des profils très différents en fonction des ligands. Par exemple, l'intensité maximale du plateau était de 2 % pour la doxorubicine, vincristine et vinblastine, alors que le H33342 était proche de la R6G, légèrement plus rapide. Ainsi, le changement de fluorescence est fortement lié à la nature du ligand ce qui laisse penser qu'il faudrait affiner l'observable émis pour modéliser les données de cinétiques dont je n'ai pas tenu compte pour simplifier les analyses.

Grâce à cette caractérisation biochimique de BmrA et du mutant E504A, j'ai pu déterminer les meilleures conditions pour étudier la transition entre la conformation IF et la conformation OF. Le but a été de ralentir la réaction pour pouvoir préparer manuellement les grilles de cryoEM en quelques secondes (12 s, 20 s, 40 s), dans les mêmes conditions de mélange que les expériences de fluorescence. Le nombre de particules associé à une conformation en fonction du temps semble corrélé avec le changement de fluorescence observé. Une question peut se poser sur la représentativité des pourcentages de conformations au cours du temps. La sélection des particules a été la même procédure pour chaque jeu de données et s'est basée sur les modèles 3D *ab initio*. L'analyse de ces conformations a aussi permis d'acquérir deux intermédiaires de la conformation IF avec une ouverture différente au niveau des NBDs qui n'ont pas été rapportés dans l'étude de la partie 1 à l'équilibre. Ceci a été confirmé avec l'analyse de la variabilité inter-particules (3DVA) en ayant en plus le continuum entre ces deux conformations. L'étude des mouvements de translations et de rotations au niveau des NBDs et des hélices transmembranaires doivent être réalisés avec l'outil *varref* pour avoir une idée plus précise des parties de la protéine impliquées. Ce travail est en cours, notamment l'affinement des structures et leur modélisation pour pouvoir poursuivre l'analyse de cette variabilité avec l'outil *varref*.

L'intérêt de cette étude a été d'apporter une nouvelle façon d'étudier le transporteur BmrA pour accéder à des informations cinétiques et dynamiques importantes dans la compréhension de son mécanisme. La question sur l'échelle de temps est pertinente dans le cas de ce transporteur car l'étude sur MsbA à l'aide d'une technique SAXS a montré que la dimérisation des NBDs était de 50 ms et leur dissociation de 1 s (Josts et al. 2020). Pour BmrA, il n'a pas été possible de descendre en dessous de 10 s dans la préparation des grilles au risque d'avoir une qualité de la grille peu exploitable. Faut-il diminuer ce temps de préparation des grilles pour pouvoir observer d'autres intermédiaires sur la grille ? Plusieurs considérations sont à prendre en compte d'un point de vue pratique et l'utilité des informations à acquérir. L'accès à des temps de l'ordre de la milliseconde implique d'utiliser une autre technique de cryoEM en temps résolu, comme une puce microfluidique. Cela nécessite de contrôler l'efficacité du mélange en détergent, le choix des temps (l'erreur entre chaque temps d'acquisition), et la qualité des grilles. Cela demande tout un travail en plus à réaliser. Ce serait intéressant de le faire mais la méthodologie employée dans le cadre de mon projet est plus facile à mettre en place et à corrélérer avec les données biochimiques. Un autre point concerne la possibilité de capturer d'autres intermédiaires entre les conformations IF et OF pendant quelques millisecondes. Au vu des résultats sur le mutant E504A, le changement de temps ne va probablement pas augmenter artificiellement la population d'intermédiaire. En effet, à partir des modèles enzymatiques, j'ai pu calculer la proportion d'espèce au cours du temps pour les mutants E504A, E504Q et WT

(Figure 62). Dans le cas du mutant E504A, seulement les espèces IF et OF ont une variation de concentration qui peut être détectée sur grille, comparé aux espèces IFA et IFAA qui ont une proportion trop faible. Ceci est le cas pour E504Q mais l'espèce IFAA représente 10 % de l'échantillon et sa durée de vie est trop courte pour la cryoEM. Par contre, la quantité d'espèces IFA et IFAA sont plus importante chez le WT. Dans le cas du projet, il serait plus intéressant d'utiliser la protéine sauvage en ralentissant la première phase pour obtenir d'autres intermédiaires grâce à l'utilisation d'analogues de l'ATP.

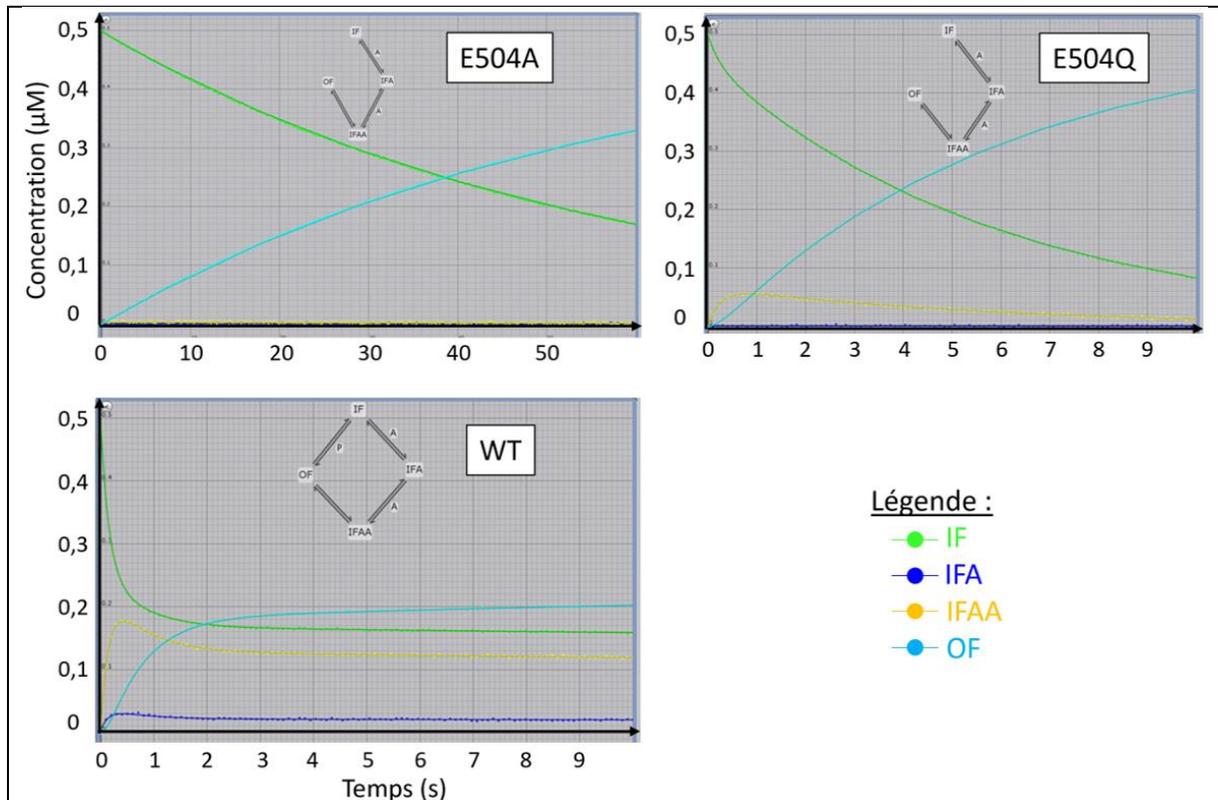


Figure 62 : Proportion des espèces en concentration (μM) au cours du temps. Ces courbes représentent la concentration de chacune des espèces du modèle (Figure 54) au cours du temps. Elles ont été calculées avec Kintek explorer en intégrant le schéma du modèle et les constantes cinétiques.

Ainsi, l'étude du temps chez les protéines représente une évolution dans le domaine de la biologie structurale qui n'est pas récent et a débuté autour des années 90 (Berriman et Unwin 1994; White, Walker, et Trinick 1998). Dans le contexte de «The resolution revolution», le développement technologique dans le domaine de la cryoEM, et surtout l'utilisation de logiciels de plus en plus performant, notamment grâce à l'intelligence artificielle, permet d'avoir accès à la personnalité des protéines et faciliter une démocratisation de ces techniques pour la communauté scientifique.

5 Partie 3 : Acquisition de la structure de BmrA dans un environnement natif

Un autre projet de ma thèse a été d'obtenir la structure de BmrA dans un environnement dit plus « natif », comparé aux détergents. J'ai mis en place et optimisé toutes les étapes de reconstitution en liposome. Ces objets ont un réel intérêt méthodologique dans la caractérisation fonctionnelle et structurale des protéines membranaires, car l'étude de ces transporteurs dans un contexte cellulaire suscite beaucoup d'intérêt et de défis dans le domaine de la biologie structurale. Au cours de cette partie, je présenterai l'importance de l'environnement amphipathique chez les transporteurs ABC sur leurs fonctions, les méthodes employées pour l'étudier, les optimisations réalisées pour acquérir la structure de BmrA dans un liposome.

5.1 Influence de l'environnement amphipathique chez les transporteurs ABC

5.1.1 L'environnement amphipathique des protéines membranaires

Les protéines membranaires sont des molécules amphipathiques qui possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe (Alberts et al. 2002). Leurs extractions de la membrane et leur purification dans un état fonctionnel est primordiale pour leurs stabilités et leurs études structurales. Ces étapes nécessitent l'emploi d'agents tensioactifs pour solubiliser ces protéines. Plusieurs outils ont été développés et sont disponibles comme des détergents, des polymères, des nanodisques (Ratkeviciute, Cooper, et Knowles 2021) (Figure 63). Les liposomes et les vésicules sont un autre moyen d'étudier ces protéines dans un environnement lipidique naturel ayant les propriétés physico-chimiques d'une bicouche lipidique des membranes cellulaires (Woubshete, Cioccolo, et Byrne 2024). Tous ces outils présentent des avantages et des inconvénients pour l'étude structurale et fonctionnelle des protéines membranaires (Tableau 9). Dans l'optique d'étudier BmrA dans un environnement amphipathique natif, je me suis intéressé aux liposomes.

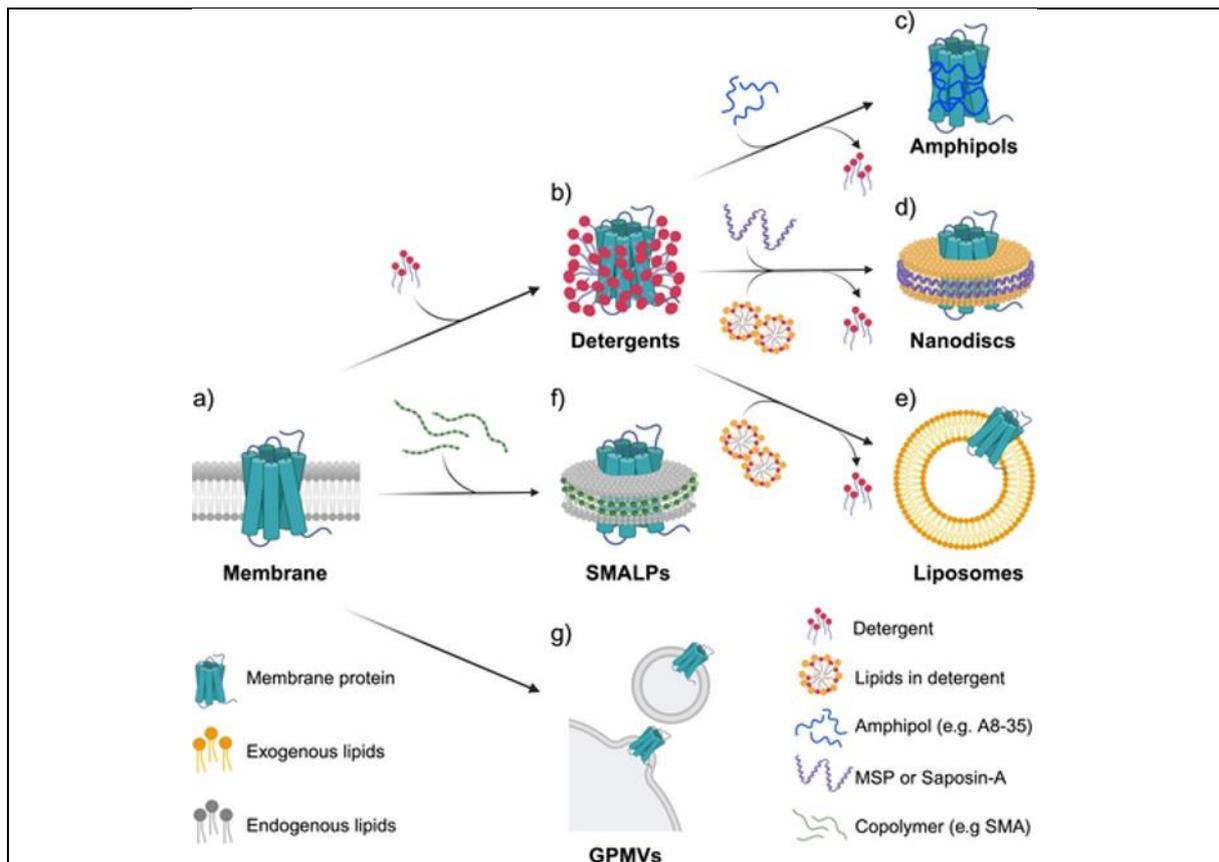


Figure 63 : Différents outils employés pour étudier les protéines membranaires. La protéine membranaire est présente dans la membrane plasmique (a). La protéine membranaire est extraite et solubilisée par des détergents (b) pour être reconstituée soit en amphipols (c), en nanodisques (d), ou en liposome (e). Une autre façon d'extraire ces protéines est d'utiliser des SMA (polymères) pour former des disques en présence des lipides natifs. Une dernière possibilité est de générer des vésicules membranaires à partir de la cellule surexprimant la protéine d'intérêt (g). Cette figure est issue de (Woubshete, Cioccolo, et Byrne 2024).

Type	Avantages	Inconvénients
Détergent	Efficacité de solubilisation des protéines membranaires. Adapté pour des études fonctionnelles et structurales. Grande variété de détergents disponibles.	Environnement non natif. Présence de micelles interférant l'analyse structural.
Amphipols	Optimal pour des analyses structurales (cryoEM). Flexible Association avec des protéines membranaires de tailles et de formes différentes.	Extraction des protéines membranaires. Limite le changement de conformation.
Polymères	Extraction sans détergent. Garde des lipides natifs autour de la protéine. Stabilité élevée. Applications pour la cryoEM.	Incompatible avec les cations divalents. Sensible au pH. La densité lipidique n'est pas physiologique.
Nanodisques	Composition lipidique adaptable. Stabilité élevée. Applications pour la cryoEM. Différentes tailles disponibles.	Dépend de l'extraction avec les détergents. Le choix du ratio protéine/lipide est empirique. Ne représente pas un environnement membranaire natif. Détermination empirique du type de MSP adapté pour la protéine.
Liposomes	Fournit un environnement plus physiologique. Adapter pour des grands complexes. Idéal pour des analyses fonctionnelles pour les transporteurs et les canaux. Grande variété de compositions lipidiques. L'asymétrie lipidique peut être généré.	Etude structural de la protéine. Dépend de l'extraction aux détergents. La courbure de la membrane peut altérer la structure de la protéine si elle est trop grande.
Membrane native	Idéal pour des protéines instables. Un environnement lipidique natif. Association des partenaires moléculaires peuvent être identifiés.	La taille des vésicules doit être suffisamment petites pour des études cryoEM. La courbure de la membrane peut altérer la structure de la protéine. Plus d'études sur la composition et l'organisation des GPMVs.

Tableau 9 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des environnements amphipathiques. Ce tableau a été construit à partir de (Johansen et al. 2023).

Les liposomes sont un assemblage de phospholipides sous la forme d'une structure sphérique constituée d'une bicouche lipidique avec un milieu intérieur aqueux. Leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres. Ils sont dénommés en fonction de leur taille et leur nature uni- ou multi-lamellaire (Figure 63), par exemple, il y a les SUVs (small unilamellar vesicles), LUVs (large unilamellar vesicles), GUVs (giant unilamellar vesicles), MLVs (multilamellar vesicles), et MVLs (multivesicular liposomes) (Yeh, Goode, et Bonev 2020).

Les protéoliposomes permettent de fournir un environnement hydrophobe plus physiologique aux protéines membranaires car les propriétés physico-chimiques se rapprochent de celles de la bicouche lipidique des membranes cellulaires comme la composition lipidique, l'asymétrie de la membrane, la courbure de la membrane, la pression latérale, les interactions lipides-protéines, et aussi la fluidité membranaire (Levental et Lyman 2023). Ils sont généralement utilisés pour des études fonctionnelles et structurales comme dans le cas de certains transporteurs ou canaux (J.-L. Rigaud 2002; Stockbridge et Tsai 2015). Plusieurs protocoles de reconstitution existent en fonction du type de protéine, de la taille du liposome, du choix de la composition lipidique, le ratio protéine-lipides, et la composition du milieu intérieur/extérieur. En général, les liposomes fabriqués sont constitués de membranes symétriques avec la même composition lipidique dans les deux feuilletts. Il est possible de générer de l'asymétrie en utilisant du méthyl- β -cyclodextrine comme transporteur de lipides (Doktorova et al. 2018). Ainsi, plusieurs étapes de la reconstitution doivent être optimisées, comme le démontre le nombre important de protocoles disponibles dans la littérature, ainsi que les différentes techniques employées comme la sonication, la congélation-décongélation, l'extrusion, ou la déstabilisation par des détergents (Godoy-Hernandez et al. 2023; Lombardo et Kiselev 2022; Jean-Louis Rigaud et Lévy 2003; Smirnova, Ädelroth, et Brzezinski 2018). Je détaillerai tous ces aspects dans la suite du manuscrit, en particulier, la reconstitution de BmrA en liposome pour des études structurales.

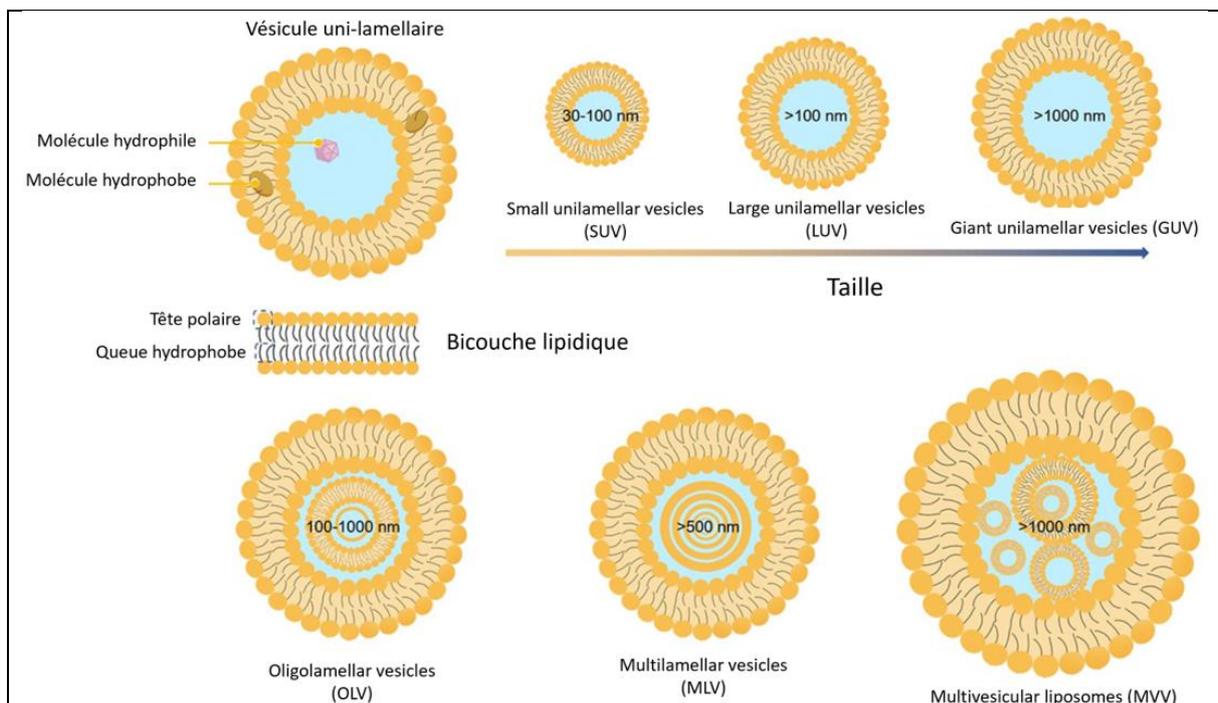


Figure 64 : Différents types possibles de liposomes.

Cette figure est issue de (Classification of Liposomes - Creative Biolabs s. d.).

En résumé, il existe plusieurs outils permettant de reconstituer les protéines membranaires purifiées en détergent. Ces agents tensioactifs jouent aussi un rôle important dans la qualité des images cryoEM (Le Bon et al. 2021). En effet, les détergents avec une CMC élevé détériorent la qualité des images à cause de leur capacité à déstabiliser les protéines membranaires, et la présence de micelles abondantes dans l'arrière-plan des images. De même, la quantité de nanodisques vides ou d'amphipols en excès peuvent impacter sur la quantité de particule à utiliser, et le contraste des images. De plus, l'intérêt d'utiliser ces environnements amphipathiques est de mimer un environnement proche de celui des membranes biologiques, et aussi d'étudier leur impact sur la dynamique des protéines membranaires, notamment sur les différentes contraintes exercés et la stabilisation de différents états conformationnels.

5.1.2 Impact fonctionnel et structural de l'environnement amphipathique sur les transporteurs ABC

Plusieurs transporteurs ABC ont été étudiés dans ces environnements amphipathiques, ayant un impact sur leur activité ATPasique, leur structure, et leur dynamique. Le transporteur ABC, MsbA, a été reconstitué en détergents, nanodisques, peptidiques, et Salipro. Son activité ATPasique est fortement influencée par ces environnements, passant de 0,003 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ à 14,6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Johansen et al. 2023). La présence de lipides améliore cette activité. De même, ils peuvent augmenter la thermostabilité des états spécifiques des protéines membranaires, mais cela n'est pas forcément lié à une augmentation de l'activité ATPasique.

L'analyse du spectre conformationnel de MsbA, stabilisé dans douze environnements (DDM, UDM, Triton X-100, LMNG, GDN, Amphipols 18, MSP1D1^{EPL}, MSP1D1^{EPL-PC}, MSP1E3D1, MSP2N2, peptidiques, amphipols A835) a été étudié par cryoEM (Hoffmann et al. 2024). Au cours de cette étude, 20 structures de MsbA ont été acquises (Figure 70). Les détergents favorisent une conformation avec une grande séparation des NBDs alors que les nanodisques induisent une conformation plus serrée. Par ailleurs, il n'y a pas une corrélation entre l'activité et la conformation d'après les auteurs. L'activité de MsbA est néanmoins plus élevée en nanodisque qu'en détergent.

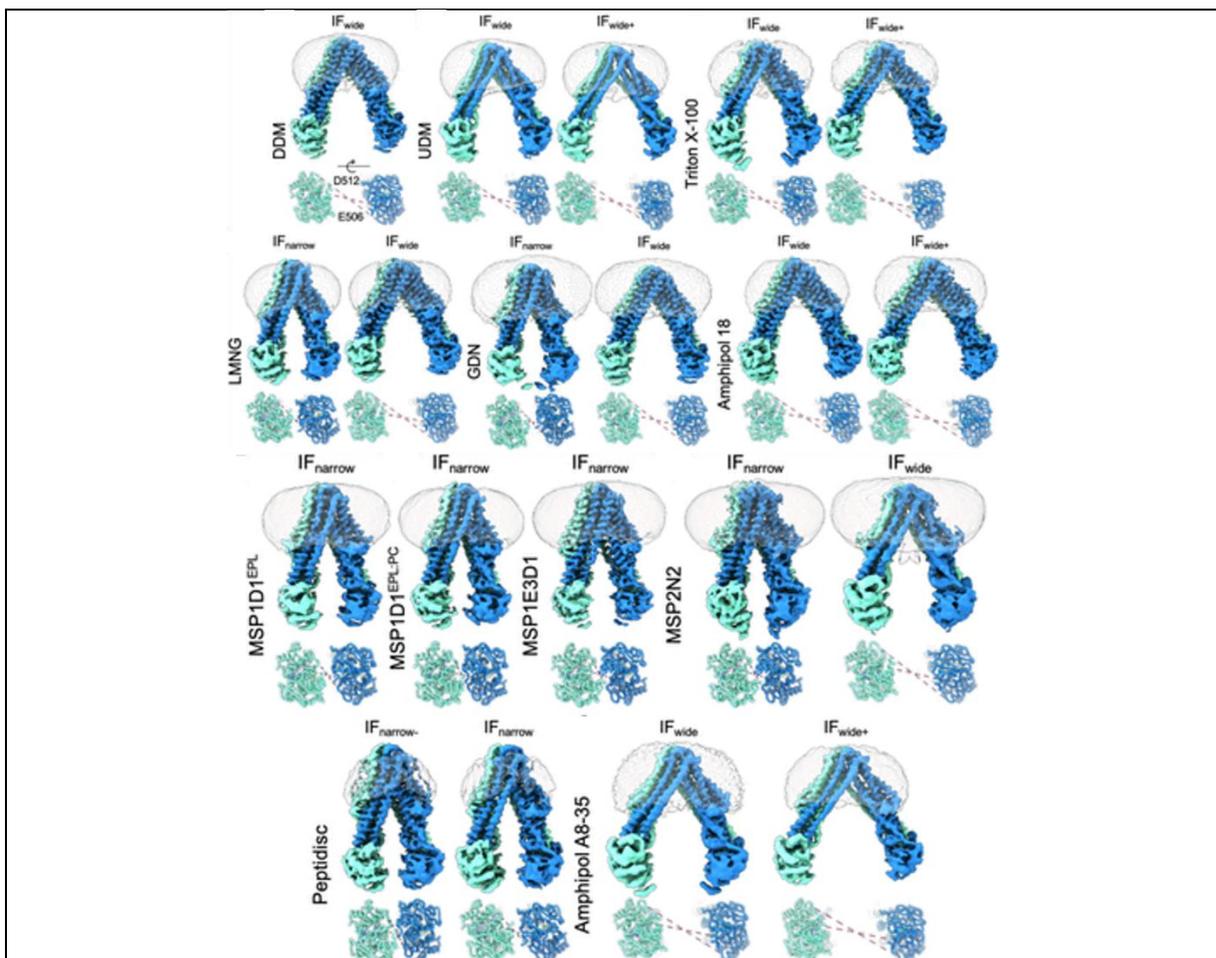


Figure 65 : Structure 3D de MsbA résolues dans 12 environnements amphipathiques différents par cryoEM.

L'environnement amphipathique autour de MsbA est représenté en gris. Chacune des structures sont montrées de vue de profil et de dessous des NBDs.

Cette figure est issue de (Hoffmann et al. 2024).

Le transporteur BmrA a aussi été étudié dans différents détergents, avec un impact sur sa stabilité et son activité ATPasique (Nguyen et al. 2018). Dans le cas des liposomes, l'impact est plus lié aux propriétés à la bicouche lipidique, notamment la courbure de la membrane. Une étude sur la sensibilité mécanique de BmrA en fonction de la courbure de la membrane a été étudié avec des SUVs et LUVs (Damm et al. 2024). L'activité de BmrA change en fonction de la courbure du liposome avec une diminution de 2,9 fois quand le diamètre du liposome diminue de 125 à 29 nm. Ainsi, les auteurs montrent que l'effet de la membrane joue aussi sur la dynamique et la géométrie de BmrA.

5.2 Reconstitution de BmrA en liposome non préformé et analyse structurale des liposomes

Au cours de ma dernière année de ma thèse, j'ai optimisé les étapes de reconstitution BmrA en liposome pour avoir le meilleur échantillon pour la cryoEM.

5.2.1 Reconstitution de BmrA en liposome non préformé

Plusieurs méthodes de reconstitutions ont été développées depuis les années 1990 (J. L. Rigaud, Pitard, et Levy 1995). Une des premières méthodes est d'ajouter des lipides solubilisés avec des protéines membranaires, préalablement purifiées en détergent. Ce dernier est ensuite éliminé à l'aide de différentes techniques (dilution, gel filtration, dialyse, Biobeads), pour permettre un autoassemblage des lipides en bicouche lipidique, intégrant la protéine. Au cours de cette étape, l'orientation de la protéine n'est pas contrôlée. Ce protocole fonctionne avec des détergents ayant une forte CMC (critical micelle concentration), sauf que les transporteurs ABC sont peu stables avec ces détergents. J'ai donc optimisé ce protocole pour reconstituer BmrA en liposome, sur la base d'autres protocoles déjà utilisés mais en les modifiant pour les besoins de la cryoEM (Steinfels et al. 2004). J'ai utilisé d'extraits lipidiques issus d'*E. coli* (Avanti). Les différentes étapes du protocole sont montrées dans la figure 66. La première étape est de mettre les lipides dans un ballon, et de former une monocouche lipidique au moment de l'évaporation du chloroforme. Ensuite, les lipides séchés sont solubilisés avec du tampon (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) en présence de détergent (DDM 0,035 %), puis incubés pendant 45 min à température ambiante. L'étape suivante est d'ajouter BmrA en DDM-cholate avec les lipides solubilisés selon un ratio molaire de 1:1000 (BmrA:lipides) ou 1:3500. Les détergents sont éliminés à température ambiante à l'aide d'ajouts successifs de Biobeads. Après une centrifugation pour culotter les Biobeads, le surnageant est récupéré et extrudé avec un filtre de diamètre 400 nm pour obtenir des liposomes homogènes en taille. Cet échantillon est ensuite déposé sur grille et visualisé sous microscope électronique à transmission en condition cryogénique.

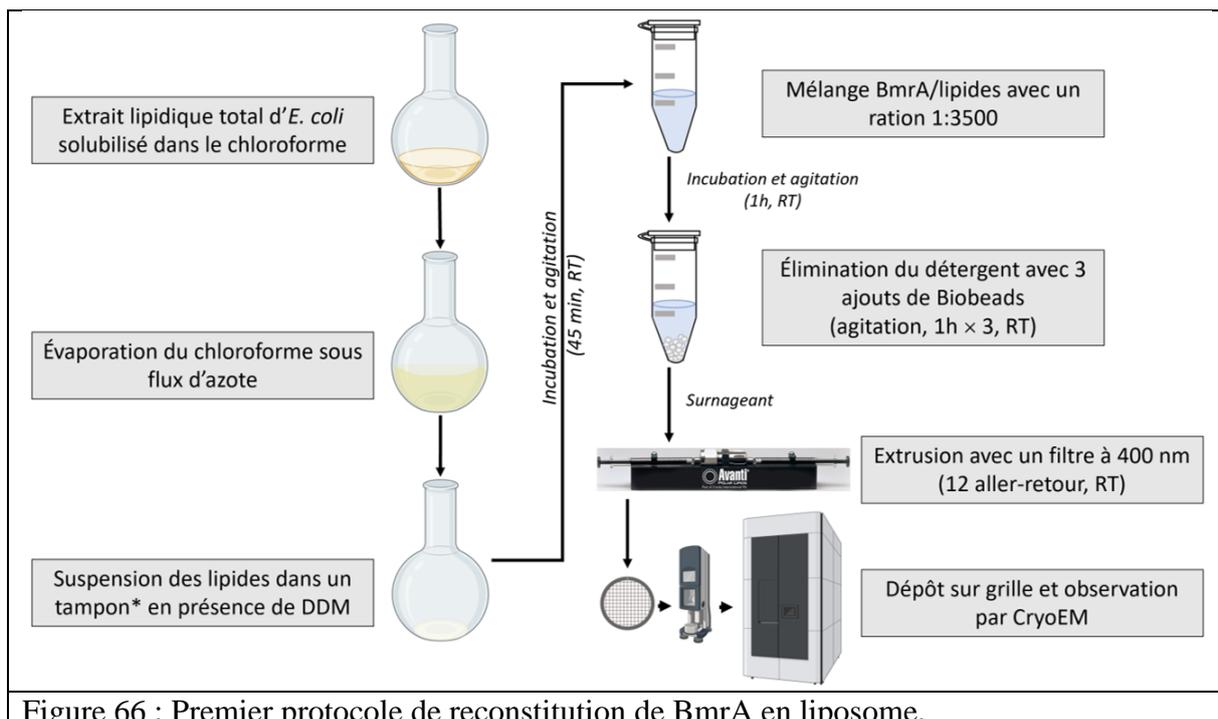


Figure 66 : Premier protocole de reconstitution de BmrA en liposome.

5.2.2 Acquisition des images cryoEM des liposomes

Avant de passer l'échantillon sur le microscope Glacios à Grenoble en collaboration avec les Drs. Guy Schoehn et Lefteris Zarkadas, nous avons réalisé plusieurs optimisations sur le choix de grilles et les paramètres de vitrification, en visualisant l'échantillon sur un microscope JEOL 1400 Flash (120 keV) au centre technologique des microstructures à Lyon. Les grilles Lacey (Lacey LC300-Au-25 carbon support) et Quantifoil (UltraAu 1.2/1.3) ont été utilisées pour observer les protéoliposomes formés. Il n'a pas été nécessaire d'hydrophiliser les grilles Lacey, contrairement aux Quantifoil. L'échantillon a été déposé sur grille pendant au moins 1 min pour augmenter la quantité de liposomes dans les trous de la grille (Lige et Ligu Wang 2020). La figure 67 montre les images de BmrA-E504A en liposome.

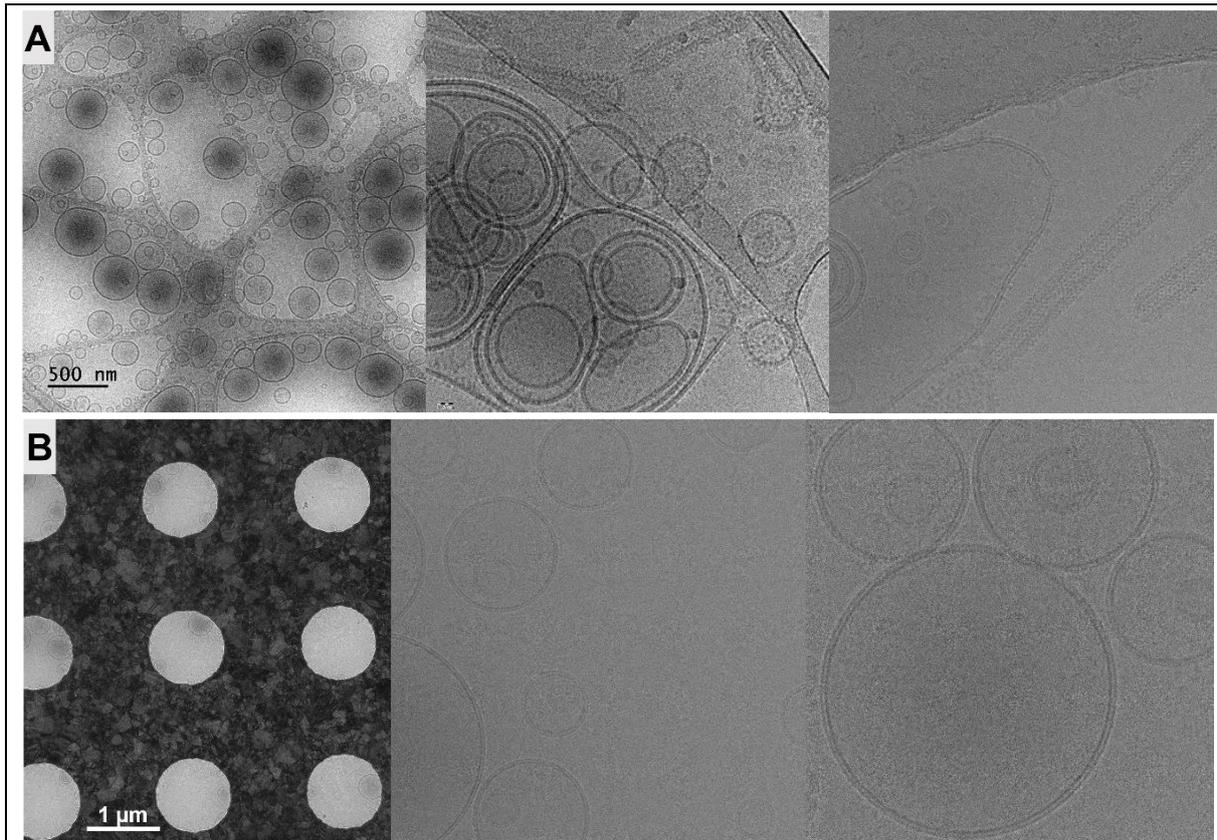


Figure 67 : Observation des liposomes contenant BmrA par cryoEM dans deux conditions de préparation.

A/ Images cryoEM des liposomes avec un ratio 1/1000 (BmrA/Lipides) déposé sur une grille Lacey.
B/ Images cryoEM des liposomes avec un ratio 1/3500 (BmrA/Lipides) déposé sur une grille Quantifoil UltraAu 1.2/1.3.

La Figure 67A montre des liposomes non homogènes de moins de 500 nm qui sont multi-lamellaires, multi-vésiculaires et se superposent. Sur la première image, les liposomes ont un contraste élevé à leur centre ce qui est dû à l'accumulation de bicouches lipidiques dense aux électrons. Des structures en forme allongées sont présentes sur la grille. Ces structures ressemblent aux roulettes de BmrA décrites précédemment (Fribourg et al. 2014). Pour détruire ces structures, il suffit de rajouter une concentration d'ATP saturante (environ 5 mM) pour que BmrA soit majoritairement en conformation OF. Au niveau de la bicouche lipidique, il est possible de distinguer des particules de BmrA qui augmente le contraste. Pour éviter la formation de roulettes, j'ai augmenté le ratio à 3500 mol de lipides par mol de dimère de BmrA,

en présence d'ATP, et j'ai aussi préalablement réalisé une sonication sur le mélange de lipides solubilisés pour réduire le nombre de liposome multi-lamellaire. Ces améliorations ont permis d'obtenir des liposomes de tailles homogènes d'environ 400 nm, avec très peu de liposome multi-lamellaire (Figure 67B).

Le nombre de liposomes par trou reste limité et leur localisation se trouve surtout à la périphérie des trous. J'ai augmenté le temps d'incubation (1, 5, 9 min) de l'échantillon sur la grille avant la vitrification mais cela n'a pas augmenté de façon notable le nombre de liposome. Une première explication de ce phénomène est peut-être dû à la nature des liposomes qui sont chargés positivement, tout comme la grille est hydrophilisé donc présentent des charges. Une autre explication probable est la relation entre l'épaisseur de la glace et la taille des liposomes. En effet, l'épaisseur de la glace est plus épaisse au bord des trous, contrairement au centre. Les liposomes d'une centaine de nanomètres peuvent se mettre à la périphérie des trous après le blotting de la grille. Ce problème va impacter sur le nombre de liposome, et donc le nombre de particules de BmrA collectés pour effectuer une classification 2D. Par ailleurs, la superposition entre les liposomes représente un autre problème pour sélectionner les particules.

5.3 Reconstitution de BmrA à partir de liposome préformé et analyse structurale par cryoEM

Malgré l'optimisation du protocole de reconstitution, la qualité de l'échantillon n'était pas suffisante pour obtenir une structure 3D de BmrA par cryoEM. De plus, l'activité ATPasique de BmrA reconstitué était plus faible par rapport aux détergents (1,05 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en détergent et 0,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en liposome). C'est pourquoi, j'ai changé de stratégie dans la préparation des liposomes, et donc la reconstitution.

5.3.1 Nouveau protocole de reconstitution de BmrA en liposome

Le protocole de reconstitution sur des transporteurs ABC en liposome a été établi pour réaliser des tests de fixation et de transport de ligand, décrit dans cette référence (Geertsma et al. 2008). Cette procédure consiste à préformer des liposomes qui vont être déstabilisés par des détergents pour accueillir un transporteur ABC (Figure 68). Les détergents sont ensuite éliminés par l'utilisation de Biobeads. Des étapes de congélation-décongélation suivit d'une extrusion sont utilisées pour incorporer des substrats à l'intérieur des liposomes, et obtenir des liposomes uni-lamellaires. Les images à côté de ce protocole représente les différents processus subit par les liposomes durant chacune des étapes.

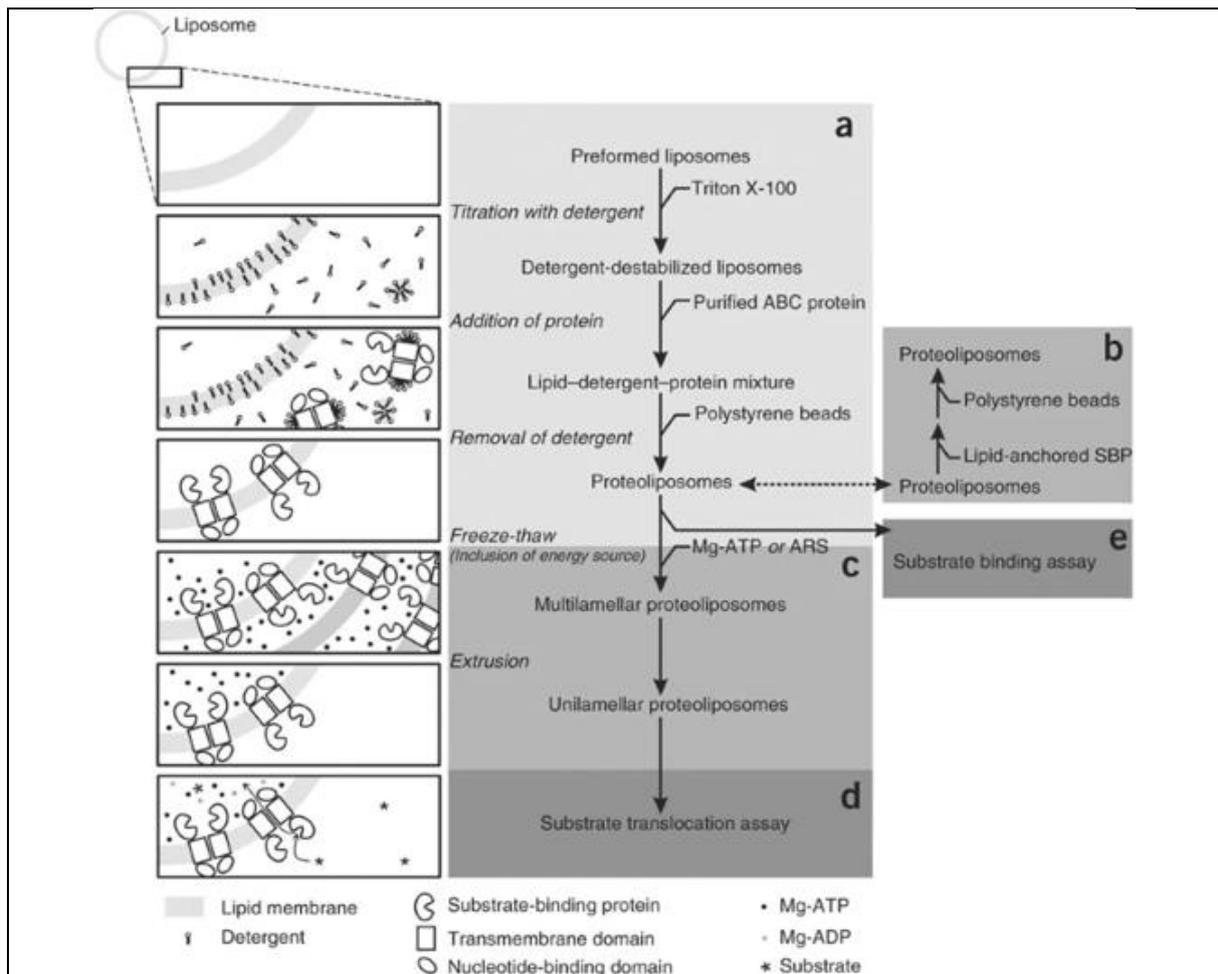


Figure 68 : Protocole de reconstitution à partir de liposome préformé.
 Cette figure est issue de (Geertsma et al. 2008).

A partir de cet article, j'ai construit un nouveau protocole pour la reconstitution de BmrA en liposome dans l'optique d'avoir un échantillon pour la cryoEM (Figure 69). Les premières étapes sont les mêmes que le protocole précédent (Figure 66) pour sécher et resuspendre les lipides. Cependant, les lipides séchés ont été remis en suspension avec du tampon (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,5) en absence de détergent. Une étape de sonication a été effectuée à partir de cette mixture. Ensuite, j'ai réalisé une courbe de déstabilisation avec des concentrations croissantes de Triton X-100 pour déterminer les indices R_{sat} et R_{sol} , et donc la quantité de détergent nécessaire pour déstabiliser les liposomes pour qu'ils intègrent BmrA (Figure 70). Ensuite, BmrA en DDM-cholate a été ajoutée en respectant le ratio 1/3500 (BmrA/lipides), puis l'ajout de Biobeads 3 fois pour éliminer les détergents. J'ai optimisé ces étapes ce qui a permis d'avoir un échantillon avec deux fois plus d'activité ATPasique qu'en détergent (1,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en détergent et 3,4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ en liposome avec la même protéine). Par ailleurs, j'ai aussi réalisé une étape de congélation-décongélation suivi d'une extrusion avec un filtre de diamètre de 400 nm après l'étape de sonication.

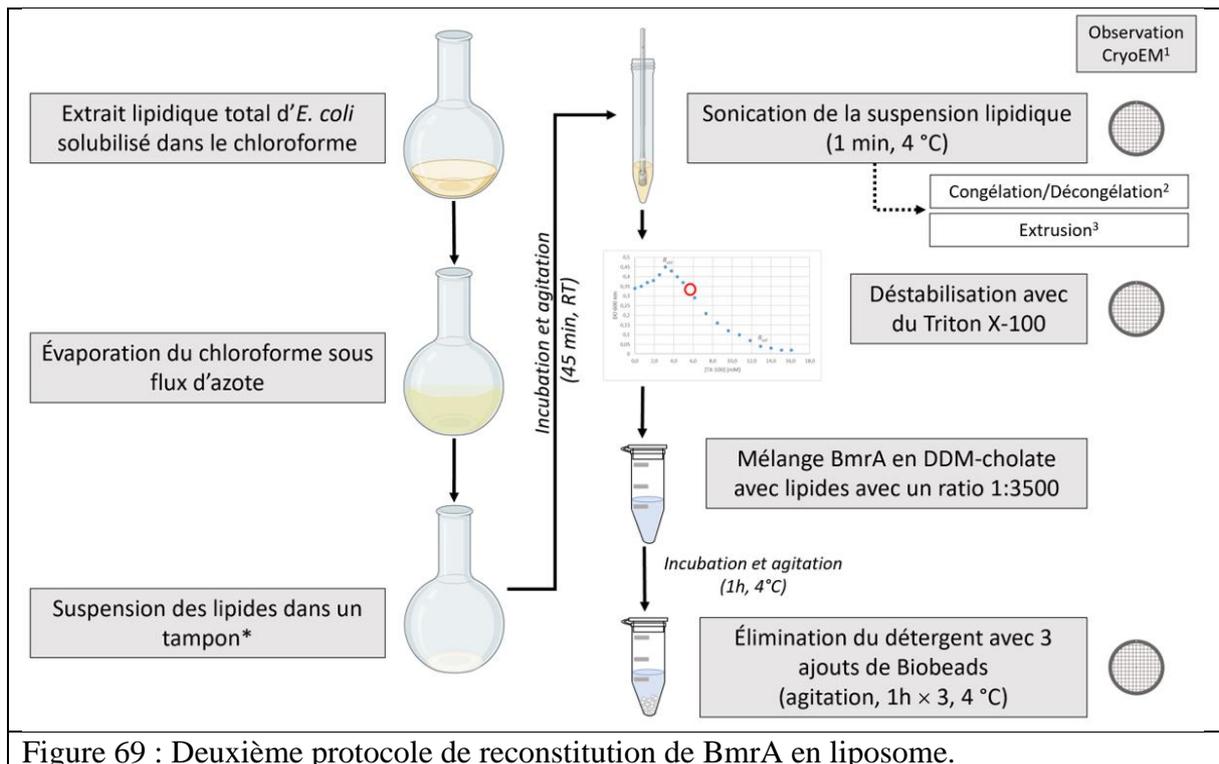


Figure 69 : Deuxième protocole de reconstitution de BmrA en liposome.

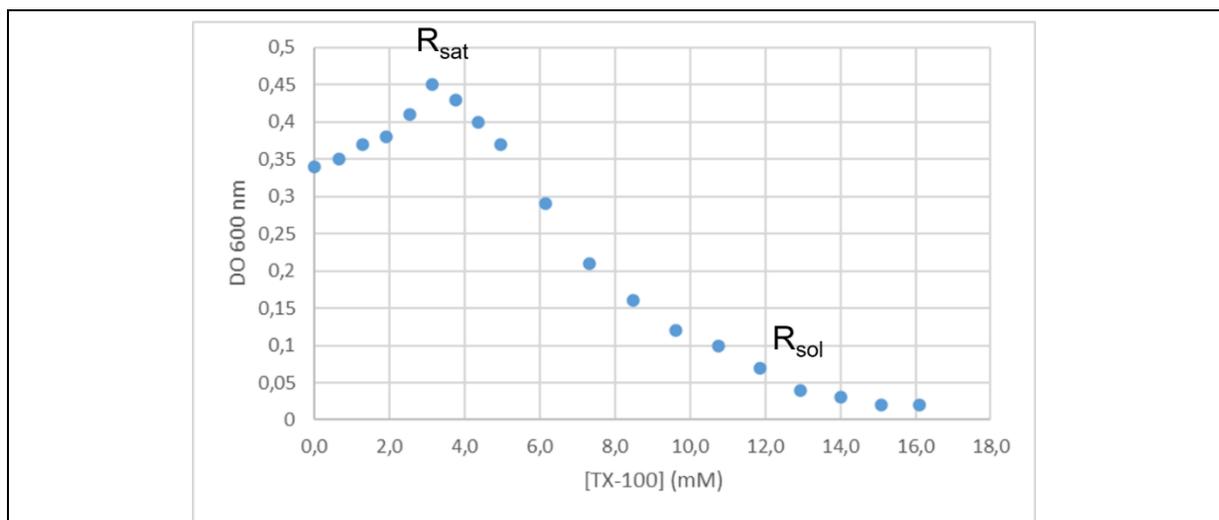


Figure 70 : Courbe de déstabilisation des liposomes par des concentrations croissantes de Triton X-100.

Cette courbe de déstabilisation suit la turbidité de l'échantillon (Absorbance à 600 nm) en fonction de concentration croissante de Triton X-100. La concentration de lipide testée est de 6,25 mg/mL. R_{sat} représente la quantité de détergent saturant la bicouche lipidique (ici, cette valeur est de 3 mM). R_{sol} représente la quantité de détergent pour solubiliser les liposomes (ici, cette valeur est de 13 mM).

Pour chaque étape du protocole, à partir de la sonication, j'ai réalisé des observations cryoEM pour caractériser les liposomes. L'idée est de suivre l'évolution du liposome au cours de la reconstitution pour déterminer les meilleures conditions permettant d'obtenir des liposomes de tailles homogènes, uni-lamellaires, se superposant peu, et une bonne répartition de la protéine au niveau de la bicouche lipidique.

5.3.2 Observations des liposomes par cryoEM pour chaque étape du protocole

Les grilles ont été préparées au centre technologique des microstructures (CTμ) sur le campus de la Doua et l'observation a été faite avec leur microscope électronique à transmission Jeol 1400 Flash (120 keV). Chaque échantillon a été incubé pendant 1 min sur une grille Quantifoil hydrophilisée, puis blottée.

Pour l'étape de sonication, les liposomes sont majoritairement uni-lamellaires mais il y a une grande diversité de taille, et certains sont multi-vésiculaires (Figure 71). En effet, la sonication est un processus qui fournit de l'énergie au liposome par des sons à hautes fréquences ce qui va déstabiliser les premières couches des liposomes formés après la remise en suspension. Certains sont de grande taille ce qui pose la question s'ils sont écrasés lors du blotting ou seulement coupés transversalement.

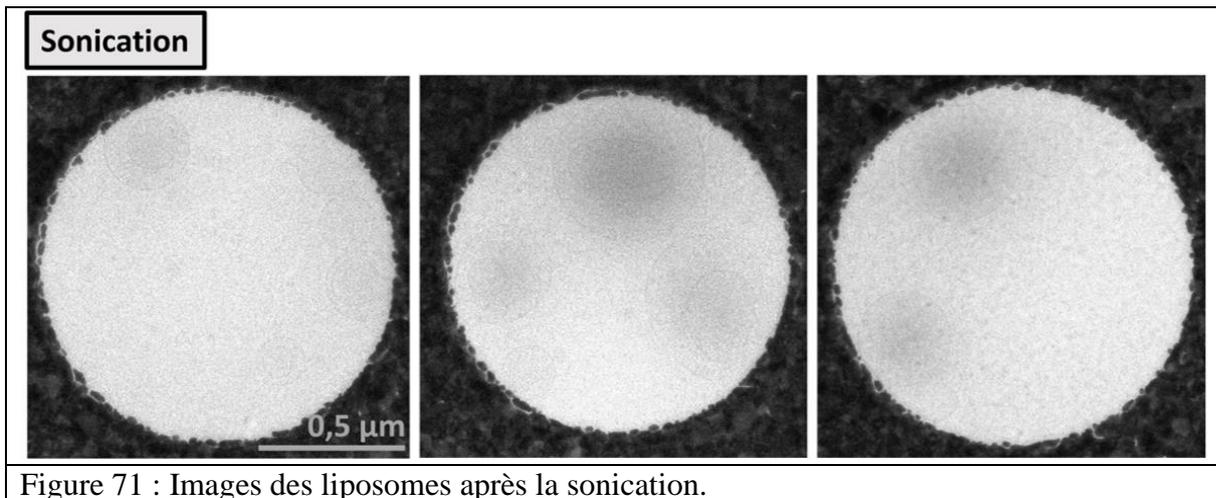
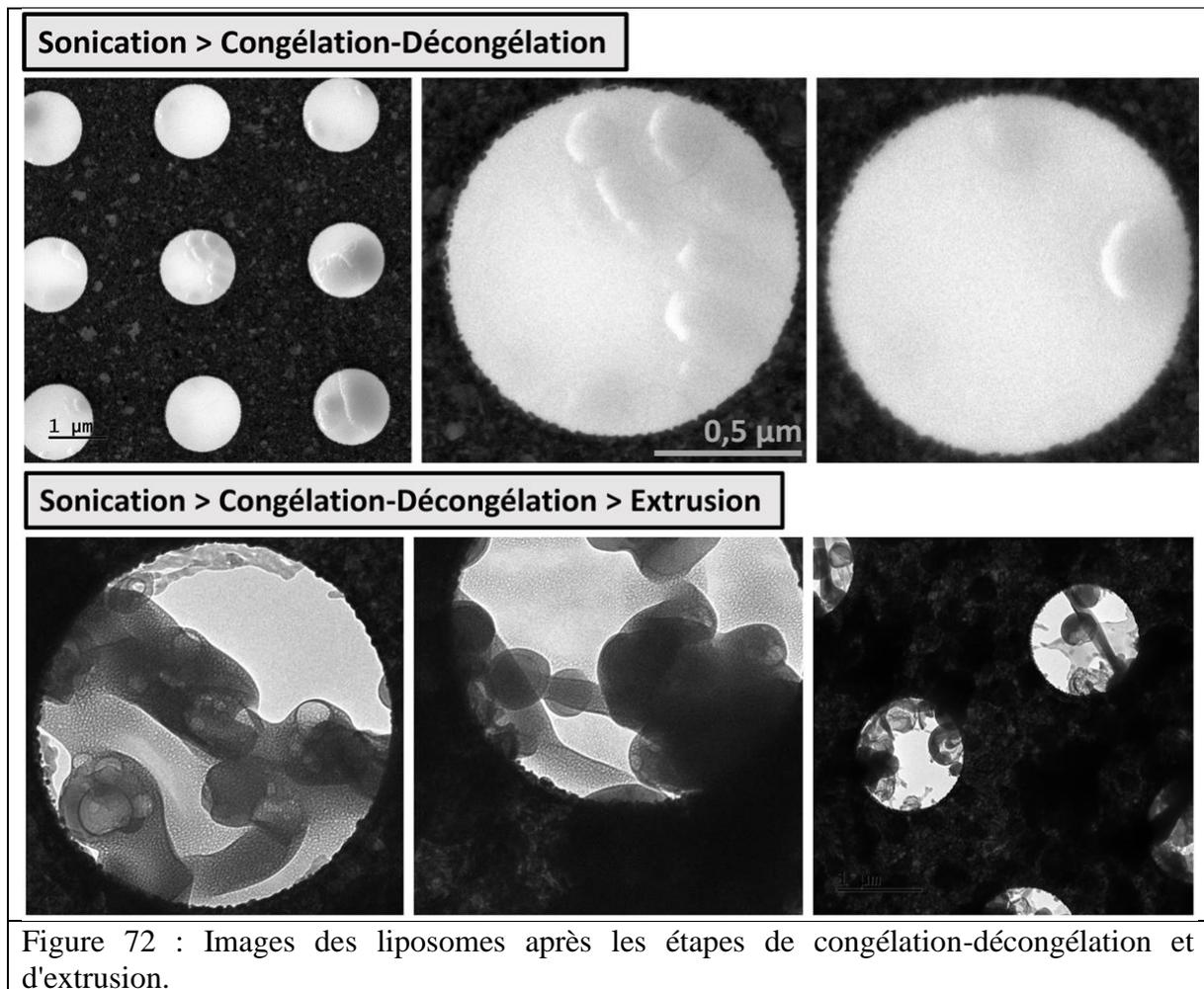


Figure 71 : Images des liposomes après la sonication.

Après l'étape de sonication, j'ai réalisé 12 cycles de congélation-décongélation puis une étape d'extrusion des liposomes. Ce processus a été décrit comme un moyen de rendre les liposomes uni-lamellaires, en particulier après l'extrusion. A la suite des congélation-décongélation, les liposomes semblent former des objets de grande taille car l'épaisseur de la glace n'était pas fine, et l'observation des grilles montre une surface cahoteuse (le contraste n'est pas uniforme) (Figure 72). L'ajout d'une étape d'extrusion ne semble pas rendre ces objets de taille plus petite et uni-lamellaires car les grilles obtenues montrent des objets très gros et de taille variable non homogène. Ainsi, pour la suite des étapes, j'ai utilisé les liposomes après sonication sans réaliser de congélation-décongélation et d'extrusion.



Lors de la déstabilisation des liposomes par le Triton X-100, j'ai testé deux conditions. La première était l'ajout d'une concentration de détergent au-delà du R_{sat} (4 mM). Nous observons plusieurs liposomes à la périphérie du trou avec des tailles de liposomes uni-lamellaires inférieurs à 200 nm (Figure 73). La deuxième condition était une concentration de détergent juste avant le R_{sol} (9 mM). Les liposomes sont devenus plus petites avec une taille inférieure à 100 nm, toujours présent à la périphérie (Figure 73). Par contre, il y a la présence d'un aspect granuleux à cet endroit ce qui correspond à la formation de micelles Triton/lipides, où on peut distinguer certains morceaux de bicouches lipidiques (cercles rouges). Ainsi, l'image théorique de la déstabilisation du liposome avec une saturation progressive de détergent ne semble pas aussi simple que celle de la figure 68.

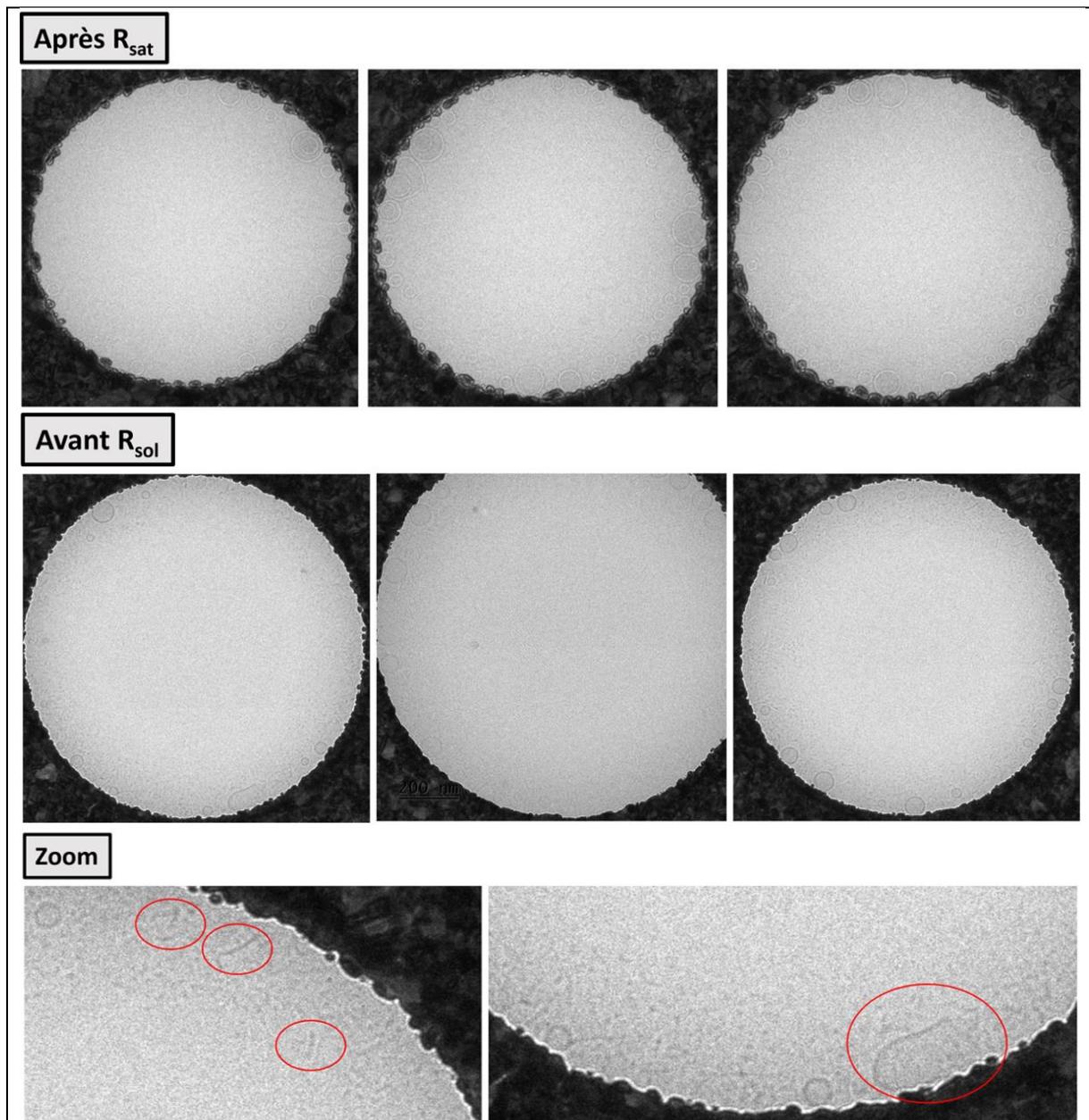


Figure 73 : Images des liposomes entre R_{sat} et R_{sol} .

Après R_{sat} : les liposomes ont été déstabilisées par 4 mM de Triton X-100.

Avant R_{sol} : les liposomes ont été déstabilisées par 9 mM de Triton X-100.

Les zooms ont été réalisés à partir des images de « Avant R_{sol} ». Les cercles en rouge montrent des morceaux de membrane.

Après la déstabilisation, la protéine est ajoutée pour être reconstituée, suivit de l'ajout de Biobeads pour éliminer les détergents. J'ai testé l'ajout de Biobeads à 4 °C et RT car il a été décrit que ce paramètre avait une influence sur la formation des liposomes en LUVs à RT et SUVs à 4 °C (Damm et al. 2024). On peut remarquer une différence dans la taille des liposomes qui sont beaucoup plus gros à RT qu'à 4 °C avec une taille d'environ 200 nm (Figure 74). Ainsi, la déstabilisation des liposomes par le détergent semble former des morceaux de membranes qui vont ensuite se rassembler pour reformer le liposome au moment du retrait des détergent par les Biobeads.

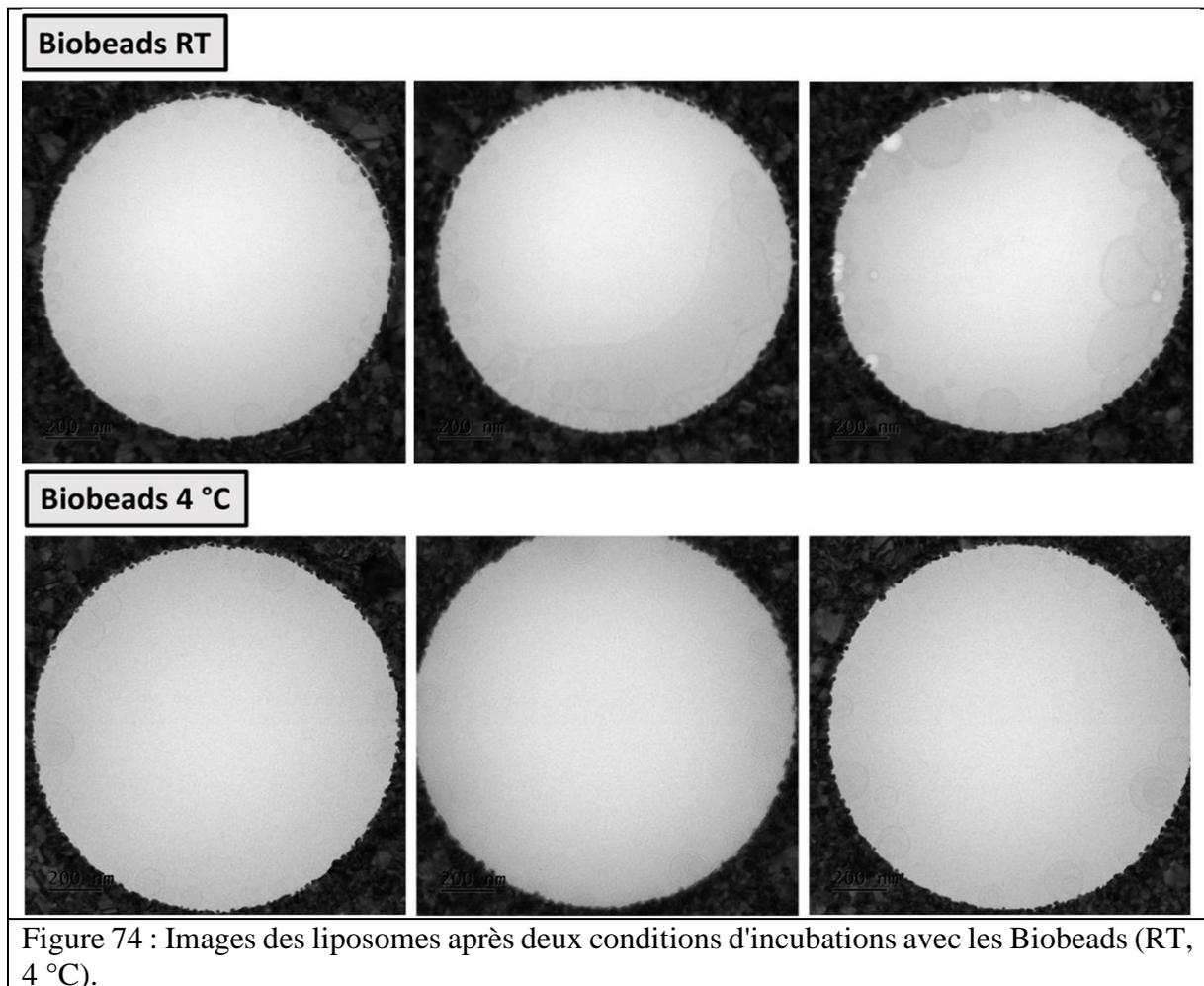
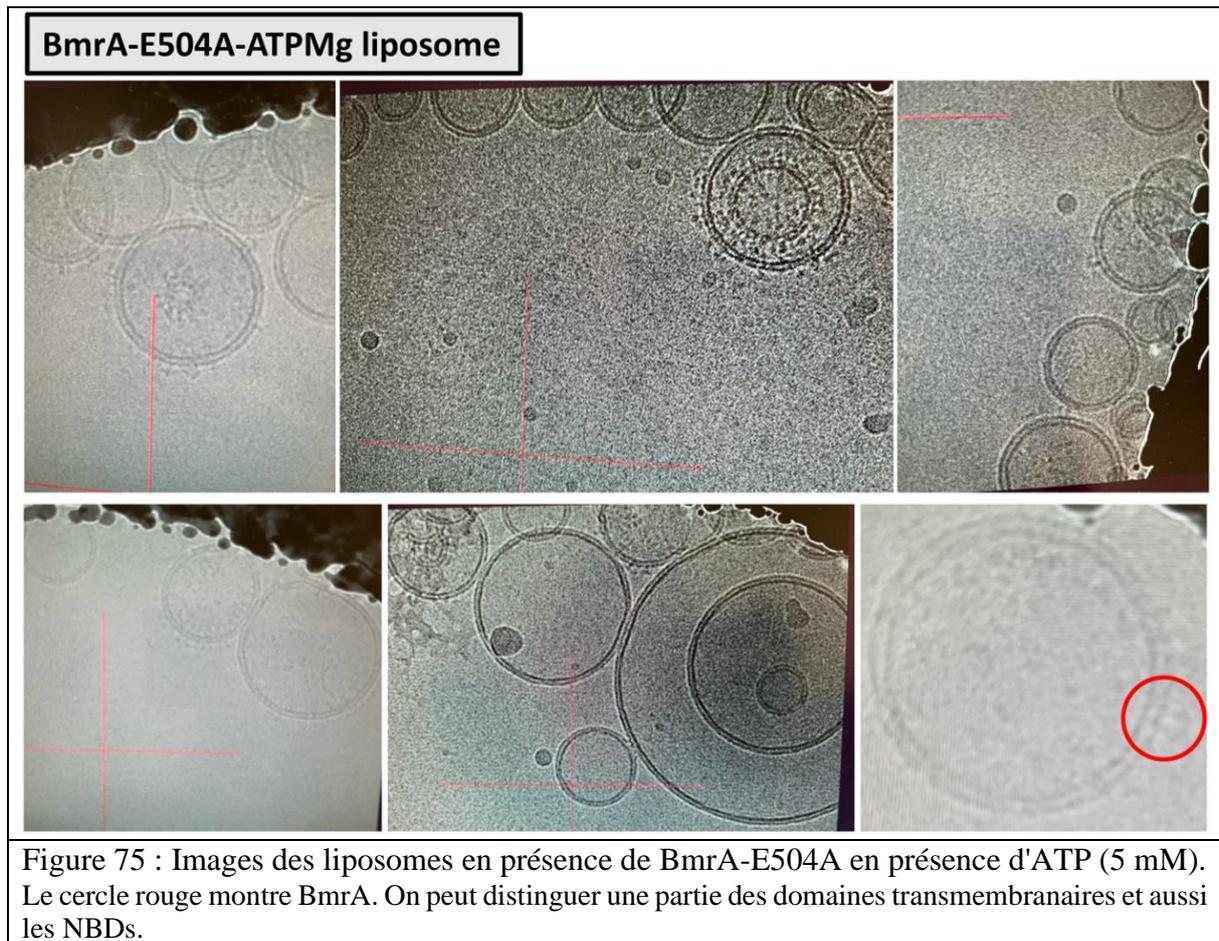


Figure 74 : Images des liposomes après deux conditions d'incubations avec les Biobeads (RT, 4 °C).

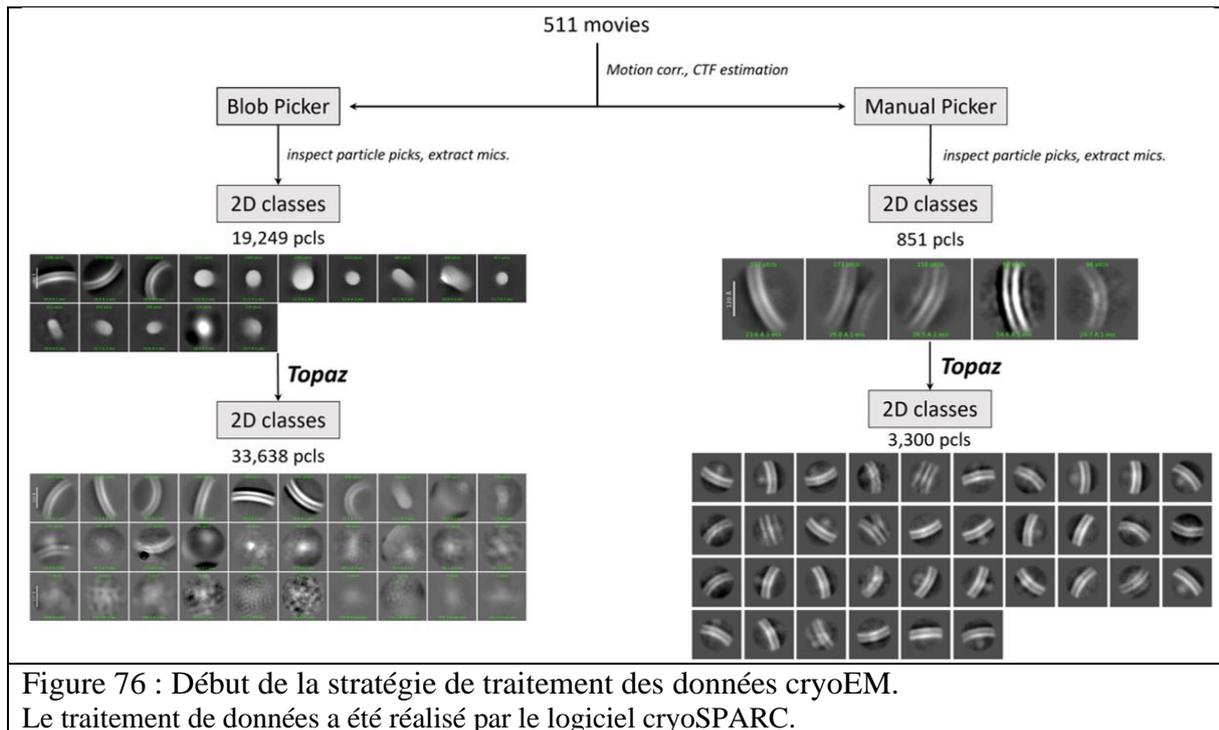
A partir de ces informations, j'ai utilisé les conditions pour obtenir des liposomes uni-lamellaires en présence de BmrA-E504A avec une concentration d'ATP (5 mM) incubé préalablement (Figure 75). La majorité des liposomes étaient de taille similaire proche de 200 nm avec certains d'une taille de 500 nm. On peut distinguer BmrA au niveau de la bicouche lipidique à l'aide d'un contraste plus important, et aussi la partie NBDs est facilement reconnaissable. Par contre, il est surprenant que certains liposomes soient très chargés en protéine contrairement à d'autres, en particulier les liposomes de plus grande taille. L'explication la plus probable serait le changement de température se produisant entre l'incubation de BmrA en présence des liposomes (température ambiante) et l'ajout de Biobeads (incubation à 4 °C). Le changement de température influence sur la vitesse de l'élimination des détergent et la reformation des liposomes. Il faudrait tester la condition à laquelle la température

est gardée constante à 4 °C pour voir s'il y aurait une meilleure répartition de BmrA parmi les liposomes.



5.3.3 Acquisition des données cryoEM préliminaires

A partir des conditions déterminées précédemment, nous avons lancé une collecte sur des liposomes en présence de BmrA-E504A avec de l'ATP (5 mM). Le microscope a eu un problème en début de collecte ce qui fait que seulement 511 movies ont été exploitables sur les 3000 collectés. Une première stratégie a été de sélectionner automatiquement les particules par un « blob picker », avec un diamètre des particules entre 100 – 200 Å. Une classification 2D de ces particules a donné quelques classes avec seulement la bicouche lipidique sans BmrA (Figure 76, gauche). En effet, l'alignement des particules se fait sur la bicouche lipidique ne permettant pas de séparer les bicouches lipidiques vides de celles contenant BmrA. C'est pourquoi, une sélection manuelle des particules sur les micrographes a été nécessaire (Figure 76, droite). Même après une sous classification des particules, un halo est présent au niveau de la bicouche lipidique. Pour améliorer cette sélection des particules, nous avons utilisé « Topaz », un modèle d'apprentissage (« deep learning ») qui sélectionne automatiquement des particules après un apprentissage sur un ensemble de particules préalablement données (Bepler et al. 2019). La sélection manuelle des particules au début permet une meilleure sélection des particules avec Topaz ce qui donne des classes 2D présentant BmrA. Le nombre de particules finales est 3 300 ce qui est trop faible pour réaliser un modèle 3D *ab initio*. Une nouvelle collecte est prévue sur un échantillon similaire sur le Titan Krios afin d'obtenir beaucoup plus de movies, et essayer de résoudre la structure dans ces conditions.



5.4 Conclusions et perspectives

La biologie structurale des protéines membranaires a beaucoup évolué, notamment les outils pour les étudier au niveau biochimique et structural. L'utilisation d'agents tensioactifs, comme les détergents, a permis d'extraire et de solubiliser ces protéines afin d'acquérir leurs structures 3D grâce à la cryoEM, ce qui a contribué en partie à quatre prix Nobel (Garavito et Ferguson-Miller 2001; Guo 2021; Hendrickson 2016). Cependant, leur environnement amphipathique ne mime plus réellement les propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique. C'est pourquoi, certains outils ont été développés pour extraire directement la protéine membranaire avec ces lipides naturels (SMA, Salipro, CyclAPols, ...) (Gulati et al. 2014; M. K. Higgins 2021; Jamshad et al. 2011). Une autre possibilité est de former des liposomes à partir des lipides de bactéries pour insérer la protéine dans un environnement plus natif. J'ai utilisé cette procédure pour reconstituer BmrA en liposome.

Plusieurs protocoles de reconstitution existent, et j'en ai testé deux en optimisant les différentes étapes pour avoir le meilleur échantillon à des fins d'étude structurale par cryoEM. Le premier protocole consistait à mélanger les lipides solubilisés avec la protéine purifiée en détergent pour former des protéoliposomes, en retirant les détergents à l'aide des Biobeads. J'ai déterminé le bon ratio entre BmrA et les lipides, la solubilisation des lipides, l'obtention de liposome uni-lamellaire ainsi que le type de grille cryoEM. En effet, l'observation de ces échantillons a pu affiner le protocole de reconstitution pour obtenir un échantillon prêt pour une collecte cryoEM. Il faut que les liposomes soient uni-lamellaires, non superposables, de tailles convenables et homogènes (< 400 nm), et une homogénéisation dans la répartition de BmrA entre les liposomes. À partir de ces points, j'ai adopté une nouvelle stratégie de reconstitution en formant préalablement les liposomes à partir de lipides soniqués. Ils sont déstabilisés avec une quantité précise de détergent, puis mis en présence de BmrA en DDM-cholate. Les détergents sont alors retirés à l'aide de Biobeads. Chacune des étapes a été optimisée tout en observant sur grille, la nature et la qualité des liposomes. Ceci a aussi remis en question certaines idées sur la reconstitution en liposome, notamment leurs déstabilisations, l'utilisation des cycles congélation-décongélation avec une extrusion, ou encore les conditions d'élimination des détergents (température d'incubation).

Grâce à une première collecte sur Glacios, il a été possible d'acquérir des classes 2D montrant BmrA enchâssée dans la bicouche lipidique des liposomes. Ces résultats prometteurs ont aussi mis en lumière certains aspects importants en ce qui concerne le traitement des données cryoEM. En effet, la sélection manuelle des particules s'est avérée particulièrement importante ainsi que l'emploi d'une méthode de deep-learning « Topaz » pour améliorer cette sélection. En effet, le principal problème a été l'alignement de la bicouche lipidique dans la formation des classes 2D, rendant difficile l'identification de BmrA. Le nombre de movies a été aussi un facteur limitant. Une nouvelle collecte est prévue pour essayer de résoudre la structure de BmrA en liposome. Une attention particulière sera faite au niveau de l'optimisation de ces différents aspects.

Les perspectives de ce travail sont d'avoir le meilleur échantillon possible pour acquérir une structure 3D de BmrA à haute résolution en liposome. Un autre intérêt est de pouvoir étudier la dynamique de BmrA dans cet environnement amphipathique presque natif à l'aide des outils d'analyse de l'hétérogénéité continue comme le 3DVA.

6 Conclusion générale

Les transporteurs ABC sont une superfamille de protéines responsable de la résistance à de nombreux médicaments chez les bactéries. Parmi ces transporteurs, certains sont capable de prendre en charge et d'exporter une multitude de molécules chimiquement différentes. Le nombre croissant de leur structure 3D ne cesse d'augmenter grâce à la cryoEM en apportant des informations sur leurs fonctions. En particulier, ces transporteurs peuvent adopter deux conformations dont l'une pour prendre en charge le médicament (conformation ouverte vers l'intérieur de la cellule, IF) et une conformation pour relarguer ce composé à l'extérieur de la cellule (conformation ouverte vers l'extérieur de la cellule, OF). Ce mécanisme a été énormément étudié par la communauté scientifique proposant plusieurs modèles du mécanisme qui comportent des particularités propres à chacun des transporteurs. La compréhension de cette relation structure-fonction n'est pas si évidente ce qui demande l'utilisation complémentaire de plusieurs techniques de biologie structurale ainsi que des techniques biochimiques et biophysiques.

Mon projet de thèse a été d'étudier le mécanisme de BmrA, un transporteur ABC de type IV exprimé par *Bacillus subtilis*, en condition d'équilibre et en temps résolu. La première partie a été consacrée sur l'impact des ligands (R6G, H33342) sur la transition de la conformation IF vers OF à l'aide d'un mutant inactif E504A. BmrA est capable de fixer l'ATP de façon différente en absence ou en présence de ligand, passant d'un comportement Michaélien à allostérique. Afin de caractériser ce phénomène, une acquisition des structures 3D d'intermédiaires durant cette transition a été réalisé en fonction de la concentration d'ATP. À partir de ces données, une analyse de la flexibilité des réarrangements moléculaires a permis de montrer que le ligand réduit l'exploration de l'espace conformationnel des NBDs, induisant une asymétrie dans la formation des NBS. L'impact fonctionnel de cette coopérativité allostérique est un couplage du transport et de l'activité ATPasique dépend de la concentration d'ATP disponible. Ce couplage disparaît lorsque la concentration d'ATP devient trop élevée. Dans un contexte cellulaire, ce mécanisme apporte un avantage sélectif pour la bactérie lorsque les conditions ne sont pas favorables (famine, phase stationnaire, ...).

La deuxième partie du manuscrit a été consacré au développement de techniques en temps résolu dont l'objectif était de compléter le mécanisme de fonctionnement de BmrA par des informations cinétiques et dynamiques. En effet, l'étude de la « personnalité » des protéines est la clé de voûte pour avoir une vision holistique sur cette relation structure-fonction. Pour accéder à ces informations spatiaux-temporelles, le temps est un paramètre important à exploiter dans les études fonctionnelles et structurales pour reconstituer une chronologie relative des événements se produisant au sein de la protéine, afin qu'elle réalise sa fonction. Parmi les outils disponibles, je me suis focalisé sur la fluorescence intrinsèque de BmrA pour suivre les changements de conformation au cours du temps, couplé à une caractérisation structurale par cryoEM en temps résolu. J'ai optimisé les différentes conditions expérimentales pour avoir une corrélation entre l'aspect enzymatique et structural. Ainsi, il a été possible d'avoir des constantes cinétiques sur le modèle présenté précédemment, et amène à de nouvelles questions sur la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. De plus, les structures acquises ont été analysées au niveau de l'hétérogénéité des particules, acquérant de nouveaux intermédiaires locaux. Ce travail est en cours de finition, mais il promet une nouvelle approche d'enzymologie structurale des transporteurs ABC pour affiner les modèles mécanistiques déjà présents.

Enfin, la dernière partie du manuscrit était axée sur la reconstitution de BmrA en liposome dans le but d'acquérir sa structure 3D dans un environnement amphipathique « naturel ». J'ai optimisé les différentes étapes du protocole de reconstitution en me basant sur l'observation des liposomes par cryoEM. Ce travail m'a permis d'acquérir une expertise sur l'obtention de ces objets ainsi que les paramètres à tenir compte pour avoir le meilleur échantillon à passer en cryoEM. Une première collecte du mutant inactif E504A reconstitué en liposome en présence d'ATP nous a permis d'avoir des classes 2D de BmrA dans un environnement de bicouche lipidique. Ce travail est en cours et nécessite de nouvelles optimisations pour l'échantillon et le traitement des données, dans le but d'avoir la structure 3D de BmrA et d'étudier sa dynamique.

Dans leur ensemble, ces résultats mettent en lumière la possibilité d'étude structure/fonction des protéines à un niveau qu'il n'était pas possible d'atteindre avant l'apparition de la cryoEM, et des « études structurales en solution ». Le lien avec la fonction est encore plus pertinent qu'il n'était avec la cristallographie. L'étude de la variabilité structurale est un pas de plus dans cette direction en ajoutant une quatrième dimension à la structure 3D qui permet d'appréhender une protéine d'une manière plus globale que simplement son repliement tridimensionnel. Enfin, l'ouverture de la cryoEM vers des systèmes beaucoup plus complexes comme les liposomes puis les membranes biologiques est un véritable boum, permettant une compréhension de plus en plus *in situ*. Je suis ravie de pouvoir vivre ces moments de science.

7 Matériels et Méthodes

7.1 Expression de BmrA

a. Transformation

Cent microlitres de bactéries de la souche *E. coli* C43(DE3) Δ AcrB compétentes sont décongelées dans la glace puis incubées avec un microlitre d'ADN plasmidique pET15b-BmrA de 200 ng/ μ L, pendant 30 min dans la glace. Dans ce vecteur, le gène codant BmrA est fusionné aux codons codant 6 histidines à l'extrémité 5' avec un promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en amont. Cette polymérase est produite par la bactérie hôte après l'induction par l'IPTG. Ce vecteur possède aussi un gène de résistance à l'ampicilline. Un choc thermique est réalisé en un incubant le mélange dans un bain marie à 42 °C pendant 40 s. Ensuite, trois cent microlitres de milieu SOC sont ajoutés aux bactéries, puis laissés une heure en incubation sous 37 °C sous agitation. Enfin, vingt microlitres de solution bactériennes transformées sont étalés sur une boîte de Pétri contenant un milieu LB-agar-ampicilline 50 μ g/ μ L. La boîte est incubée sur la nuit à 37 °C.

b. Culture et induction

Une colonie isolée est utilisée pour ensemercer 3 mL de milieu LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline pendant 7 h, à 37 °C sous agitation (190 rpm). Puis, un prélèvement de 30 μ L de cette préculture est ajoutée à 1 L de milieu LB-ampicilline autoclavé. La culture est incubée à 22 °C sous agitation (190 rpm), et lorsque la densité optique du milieu à 600 nm atteint 0,6, l'expression de BmrA est induite avec 0,7 mM d'IPTG. L'induction de la culture a lieu pendant 5-6 h à 22°C, toujours sous agitation. Enfin, les bactéries sont récoltées par centrifugation à 5 000 g, pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est stocké à – 80 °C.

c. Récupération des membranes enrichies en BmrA

Le culot est suspendu dans 50 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM. Les bactéries sont ensuite lysées par 3 passages à 1,5 kbar (18 000 psi) à 4 °C par un broyeur Constant System Ltd. Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 g, pendant 30 min à 4 °C. Seulement le surnageant est à nouveau centrifugé à 180 000 g, pendant 1 h à 4 °C. Le culot est ensuite récupéré en le reprenant dans 25 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM et antiprotéases CLAPA 1X. Une nouvelle centrifugation est effectuée à 180 000 g, pendant 1 h à 4 °C. Le culot est suspendu dans 5 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, sucrose 300 mM, et stocké dans l'azote liquide. Un aliquot de 50 μ L est conservé pour être déposé sur gel SDS-PAGE et pour être quantifié par un dosage protéique.

d. Dosage protéique (méthode BCA)

Dans une plaque de 96 puits, 10 μ L d'échantillon dilué au dixième par de l'eau avec un volume final de 20 μ L (deux triplicats avec 2 μ L et 4 μ L d'échantillons sont testés). Ce volume est complété avec 180 μ L de mélange réactionnel. Un mélange réactionnel est préparé avec 5 mL

de BCA pour 100 μ L de sulfate de cuivre. En parallèle une gamme étalon de BSA de 0 à 10 μ g est réalisée. Avant la lecture de l'absorbance, les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 5 min. L'absorbance (Abs) est ensuite lue à 562 nm. Le spectromètre utilisé est le SAFAS. Une courbe étalon $Abs = f(C_{\text{protéine}})$ est calculée pour permettre d'en déduire la concentration protéique.

7.2 Purification

a. Solubilisation

Les membranes sont solubilisées à 3 mg/mL dans Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, glycérol 15 %, CLAPA 1X, Triton X-100 4,5 % pendant 1h20, à 4 °C sous agitation. La solution est ensuite centrifugée 40 min, 100 000 g à 4 °C.

b. Chromatographie d'affinité

Une colonne de 5 mL Ni²⁺-NTA HisTrap (GE-Healthcare) est installé sur une Fast Protein Liquid Chromatography - Äkta PrimePlus (GE-Healthcare) et équilibrée avec 25 mL de tampon d'équilibration Tris-HCl 20 mM pH 8, 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. Un lavage est effectué à partir d'un tampon composé de HEPES-NaOH 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazole 20 mM, DDM 0,0675 %, Na-Cholate 0,04 %. La protéine est ensuite éluée avec le tampon d'éluion contenant 200 mM d'imidazole. Le regroupement des fractions éluées du pic est récupéré puis diluées 10 fois dans du tampon d'éluion sans imidazole. La solution est à nouveau chargée sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon d'équilibration pour subir une nouvelle purification dans les mêmes conditions décrites précédemment.

c. Chromatographie d'exclusion stérique

Les fractions de la purification d'affinité sont regroupées puis concentrées avec un filtre Amicon 50 kDa, à 1000 g pendant 10-15 min, à 4 °C, jusqu'à un volume final de 500 μ L. Le concentrat est alors injecté sur la colonne Superdex 200 10/300 préalablement équilibrée avec 25 mL de tampon HEPES-NaOH 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035 %, Na-Cholate 0,03 %. La concentration protéique dans chaque fraction est mesurée à l'aide d'un Nanodrop puis les fractions sont stockés à 4°C.

d. SDS-PAGE

Dix microlitres de chaque fraction sont incubés dans 3,3 μ L de tampon Laemmli 4X composé de Tris-HCl 1 M pH 8, SDS 8 %, bleu de bromophénol 0,025 %, beta-mercaptoéthanol 2,8 M, glycérol 40 %, pendant au moins 15 min à température ambiante.

Le gel de séparation est composé d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5:1) 10 % (v/v), Tris-HCl 0,4 M pH 8,8, SDS 0,1 % (v/v), persulfate d'ammonium 0,1 % (v/v), et TEMED 0,4 % (v/v).

Le gel de concentration est composé d'acrylamide/bis-acrylamide 5 %, Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfate d'ammonium 0,1 %, et TEMED 0,4 %.

Les échantillons sont chargés sur le gel dans du tampon TG-SDS 1X et migrent pendant 15 min à 90 V, puis 1h30 à 120 V. Le gel est ensuite coloré pendant 30 min sous agitation dans une solution de bleu de Coomassie composé d'éthanol 1 %, isopropanol 25 %, acide acétique 10 %, et bleu de Coomassie R250 0,025 %. Puis il est décoloré pendant 1h dans une solution acétique 10 %.

7.3 Reconstitution en liposome

Un millilitre d'extrait lipidique d'*E. coli* (Avanti) solubilisé à 25 mg/mL en chloroforme a été mis dans un ballon de 250 mL. La composition lipidique de cet extrait est 57,5 % (w/w) de phosphatidyléthanolamine, 15,1 % de phosphatidylglycérol, 9,8 % de cardiolipine, et 17,6 % de composés inconnus. Ces lipides sont séchés sous un flux d'azote gazeux et sont répartis sur les parois du ballon pour former un film lipidique par rotation du ballon. L'étape de séchage dure au moins 10 min pour éliminer le chloroforme. Ces lipides sont ensuite remis en suspension avec 2 mL de tampon HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,5, sous agitation et incubé pendant 1h. Une sonication est réalisée sur ces lipides à température ambiante pendant 1 min 30 (cycle duty 20 %, output cycle 3) à l'aide de l'appareil Branson Ultrasonics, Sonifier, modèle 250/450. Ces lipides sont préalablement dilués par 2 pour être à une concentration de 6,25 mg/mL, pour être déstabilisés avec 4 mM de Triton X-100. BmrA en DDM-cholate est ensuite ajouté en respectant le rapport molaire 1 mol de dimère de BmrA pour 3500 mol de lipides, suivi d'une incubation de 45 min à température ambiante. Afin d'éliminer les détergents, l'ajout de Biobeads a été réalisé en 3 fois à 4 °C sous agitation pendant 1h, 2h puis sur la nuit. La quantité de Biobeads nécessaire a été calculé d'après la capacité d'adsorption des Biobeads indiquée dans l'article (J.-L. Rigaud et al. 1998).

7.4 Tests fonctionnels

a. Fixation de substrats

La fixation du ligand ou des nucléotides sur BmrA est testée par mesure de 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, 0,5 µM de BmrA sont incubés ou non avec 100 µM de ligands 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 dans des cuves en quartz. Des concentrations croissantes de nucléotides sont ajoutées dans la cuve. Un contrôle négatif avec des résidus de tryptophane libres, N-acétyl tryptophanamide (NATA) est réalisé afin d'enlever la fixation non spécifique du ligand.

b. Fluorescence en temps résolu

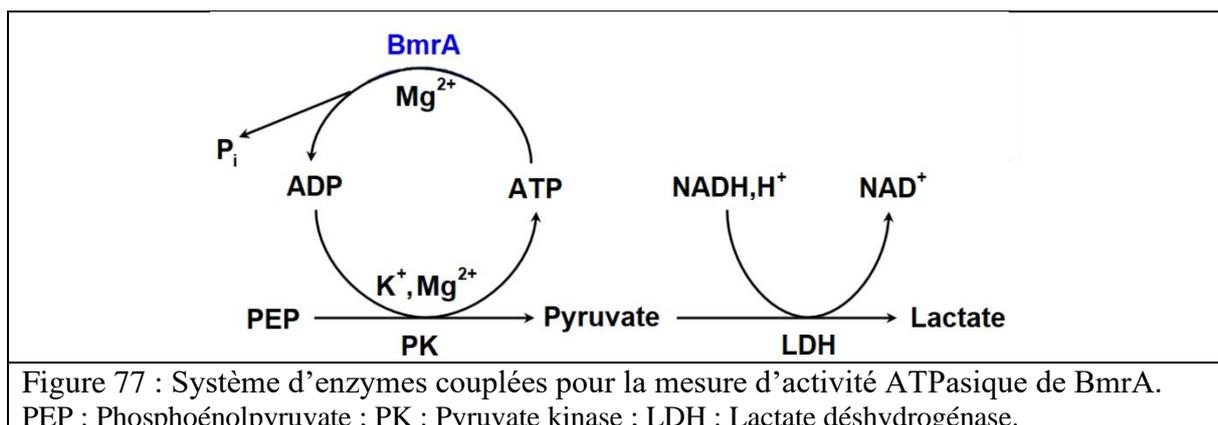
La mesure s'est faite à l'aide un spectrofluorimètre SAFAS Xenius. Le voltage du photomultiplicateur est réglé sur 570 V pour avoir un signal saturé au départ. La fluorescence intrinsèque de BmrA est suivie au cours du temps en réglant la longueur d'onde d'excitation à 290 nm avec une bande passante de 5 nm, et la longueur d'onde d'émission est réglé sur 328 nm avec une bande passante de 7 nm. Un volume de 180 μL de BmrA purifiée en DDM-cholate est ajouté dans une cuve en quartz à fond transparent, pour être à une concentration finale de 2 μM . Un ajout successif des composés est réalisé. La R6G est ajoutée et mélangée en premier dans la cuve avec 10 μL à 1 mM. Le signal est atténué de 50 %. Le deuxième composé est l'ATP-Mg²⁺ avec 10 μL à 6 mM. Les composés sont préparés dans le même tampon que la protéine, c'est-à-dire (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035 %, Cholate 0,03 %).

c. Stopped-flow

Les mesures ont été réalisées avec un stopped-flow « SF-61 DX2 Double Mixing Stopped-Flow System ». BmrA a été préalablement incubé avec la R6G pour être à une concentration finale de 2 μM et 100 μM respectivement. Différentes concentrations d'ATP ont été testées sur cet échantillon. Toutes les expériences ont été réalisées à 21 °C. L'échantillon a été excité à 290 nm, et l'intensité de fluorescence a été enregistré en fonction du temps avec un filtre interférentielle entre 310 nm et 360 nm, centré sur 330 nm.

d. Activité ATPase

L'activité ATPase de BmrA purifiée est mesurée grâce à un système couplé d'enzymes (Figure 77).



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 du NADH, la mesure de la disparition du NADH à 340 nm permet de connaître l'activité de BmrA. L'expérience est réalisée dans une cuve. 5 μg de BmrA sont dilués dans HEPES-NaOH 20 mM pH7,5, NaCl 100 mM, DDM 0,035%, Na-Cholate 0,03%

Le mélange réactionnel est composé de PEP 1 mM, PK 0,1 mg/ml, LDH 0,1 mg/ml, DDM 0,035%, Na-Cholate 0,03%, NADH 0,6 mM, et une concentration d'ATP choisie.

La cinétique est enregistrée sur le SAFAS pendant 20 min à 25 °C en suivant l'absorbance à 340 nm.

e. Transport

La mesure de l'activité de transport est réalisée sur des vésicules de membranes inversés contenant BmrA. Pour visualiser le transport, des molécules fluorescentes (Hœchst 33342 et doxorubicine) sont utilisées.

Les vésicules sont pré-incubées avec les composés fluorescents. Le changement d'environnement d'hydrophile à hydrophobe augmente la fluorescence. L'ajout d'ATP va permettre le transport des composés qui est visualisé par une diminution de la fluorescence.

Les membranes inversées sont préparées à partir de la préparation de membranes récupérées. Dans une cuvette de quartz, 50 µg de protéine ont été ajoutés au tampon (50 mM HEPES pH8, 5 mM MgCl₂, 8,5 mM NaCl) à 25 °C. Après 2 min d'incubation, 2 µM de composés fluorescent est ajouté. Après 3 min d'incubation, le transport est initié par l'ATP.

Le spectrofluorimètre SAFAS Xenius est utilisé pour enregistrer le transport. La fluorescence est enregistrée à une longueur d'émission de 590 nm avec une bande passante de 4 nm sous une longueur d'excitation de 480 nm avec une bande passante de 2 nm pour la doxorubicine, et 457 nm d'émission avec une excitation à 355 nm pour le Hœchst 33342.

7.5 Etude structurale par cryoEM : préparation des grilles

Le pool des fractions du pic de la chromatographie d'exclusion stérique est concentré à 1000 g, 10 min, à 4°C, jusqu'à 3,5 mg/mL, ou 4 mg/mL avec ses substrats. L'ajout de R6G ou H33342 à 100 µM est incubé 15 min dans la glace et l'ajout d'ATP aux concentrations désirées si présents dans l'échantillon.

La préparation des grilles s'est faite avec un Vitrobot Mark IV (ThermoFischer) à 22 °C et 100 % d'humidité. Les grilles sont hydrophilisées puis 3,5 µL d'échantillon sont déposés, puis l'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 observé sur le microscope ultérieurement.

8 Références bibliographiques :

- Aa, Neyfakh. 2002. « Mystery of Multidrug Transporters: The Answer Can Be Simple ». *Molecular microbiology* 44(5). doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02965.x.
- Alam, Amer, Julia Kowal, Eugenia Broude, Igor Roninson, et Kaspar P. Locher. 2019. « Structural Insight into Substrate and Inhibitor Discrimination by Human P-Glycoprotein ». *Science (New York, N.Y.)* 363(6428): 753-56. doi:10.1126/science.aav7102.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « Membrane Proteins ». In *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*, Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26878/> (1 septembre 2024).
- Alcock, Brian P., William Huynh, Romeo Chalil, Keaton W. Smith, Amogelang R. Raphenya, Mateusz A. Wlodarski, Arman Edalatmand, et al. 2023. « CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database ». *Nucleic Acids Research* 51(D1): D690-99. doi:10.1093/nar/gkac920.
- Amann, Sascha Josef, Demian Keihlsler, Tatyana Bodrug, Nicholas G. Brown, et David Haselbach. 2023. « Frozen in time: analyzing molecular dynamics with time-resolved cryo-EM ». *Structure* 31(1): 4-19. doi:10.1016/j.str.2022.11.014.
- Amano, T., K. Tozawa, M. Yoshida, et H. Murakami. 1994. « Spatial Precision of a Catalytic Carboxylate of F1-ATPase Beta Subunit Probed by Introducing Different Carboxylate-Containing Side Chains ». *FEBS letters* 348(1): 93-98. doi:10.1016/0014-5793(94)00588-5.
- Autzen, Henriette E., David Julius, et Yifan Cheng. 2019. « Membrane Mimetic Systems in CryoEM: Keeping Membrane Proteins in their Native Environment ». *Current opinion in structural biology* 58: 259-68. doi:10.1016/j.sbi.2019.05.022.
- Barends, Thomas R. M., Benjamin Stauch, Vadim Cherezov, et Ilme Schlichting. 2022. « Serial Femtosecond Crystallography ». *Nature Reviews Methods Primers* 2(1): 1-24. doi:10.1038/s43586-022-00141-7.
- Bársony, Orsolya, Gábor Szalóki, Dóra Türk, Szabolcs Tarapcsák, Zsuzsanna Gutay-Tóth, Zsolt Bacsó, Imre J. Holb, et al. 2016. « A Single Active Catalytic Site Is Sufficient to Promote Transport in P-Glycoprotein ». *Scientific Reports* 6: 24810. doi:10.1038/srep24810.
- Bepler, Tristan, Andrew Morin, Micah Rapp, Julia Brasch, Lawrence Shapiro, Alex J. Noble, et Bonnie Berger. 2019. « Positive-Unlabeled Convolutional Neural Networks for Particle Picking in Cryo-Electron Micrographs ». *Nature Methods* 16(11): 1153-60. doi:10.1038/s41592-019-0575-8.
- Berntsson, Ronnie P.-A., Sander H. J. Smits, Lutz Schmitt, Dirk-Jan Slotboom, et Bert Poolman. 2010. « A Structural Classification of Substrate-Binding Proteins ». *FEBS letters* 584(12): 2606-17. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.043.

- Berriman, John, et Nigel Unwin. 1994. « Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets ». *Ultramicroscopy* 56(4): 241-52. doi:10.1016/0304-3991(94)90012-4.
- Bhattacharjee, Biddut, Md Mahfuzur Rahman, Ryan E. Hibbs, et Michael H. B. Stowell. 2023. « A Simple Flash and Freeze System for Cryogenic Time-Resolved Electron Microscopy ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 10: 1129225. doi:10.3389/fmolb.2023.1129225.
- Bhattacharjee, Sayan, Xiangsong Feng, Suvrajit Maji, Prikshat Dadhwal, Zhening Zhang, Zuben P. Brown, et Joachim Frank. 2024. « Time Resolution in Cryo-EM Using a PDMS-Based Microfluidic Chip Assembly and Its Application to the Study of HflX-Mediated Ribosome Recycling ». *Cell* 187(3): 782-796.e23. doi:10.1016/j.cell.2023.12.027.
- Blanco, Paula, Sara Hernando-Amado, Jose Antonio Reales-Calderon, Fernando Corona, Felipe Lira, Manuel Alcalde-Rico, Alejandra Bernardini, Maria Blanca Sanchez, et Jose Luis Martinez. 2016. « Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants ». *Microorganisms* 4(1): 14. doi:10.3390/microorganisms4010014.
- Bodrug, Tatyana, Kaeli A. Welsh, Derek L. Bolhuis, Ethan Paulakonis, Raquel C. Martinez-Chacin, Bei Liu, Nicholas Pinkin, et al. 2023. « Time-resolved cryo-EM (TR-EM) analysis of substrate polyubiquitination by the RING E3 anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) ». *Nature Structural & Molecular Biology* 30(11): 1663-74. doi:10.1038/s41594-023-01105-5.
- Bolla, Jani Reddy, Anna C. Howes, Francesco Fiorentino, et Carol V. Robinson. 2020. « Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump AceI ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(29): 17011-18. doi:10.1073/pnas.2003271117.
- Bolla, Jani Reddy, Chih-Chia Su, Jared A. Delmar, Abhijith Radhakrishnan, Nitin Kumar, Tsung-Han Chou, Feng Long, Kanagalaghatta R. Rajashankar, et Edward W. Yu. 2015. « Crystal Structure of the Alcanivorax Borkumensis YdaH Transporter Reveals an Unusual Topology ». *Nature Communications* 6(1): 6874. doi:10.1038/ncomms7874.
- Bondar, Ana-Nicoleta, Marcus Elstner, Sándor Suhai, Jeremy C Smith, et Stefan Fischer. 2004. « Mechanism of Primary Proton Transfer in Bacteriorhodopsin ». *Structure* 12(7): 1281-88. doi:10.1016/j.str.2004.04.016.
- Bordeleau, Emily, Peter J. Stogios, Elena Evdokimova, Kalinka Koteva, Alexei Savchenko, et Gerard D. Wright. 2021. « ApmA Is a Unique Aminoglycoside Antibiotic Acetyltransferase That Inactivates Apramycin ». *mBio* 12(1): e02705-20. doi:10.1128/mBio.02705-20.
- Borg, Anneli, Michael Pavlov, et Måns Ehrenberg. 2016. « Complete Kinetic Mechanism for Recycling of the Bacterial Ribosome ». *RNA (New York, N.Y.)* 22(1): 10-21. doi:10.1261/rna.053157.115.

- Brändén, Gisela, et Richard Neutze. 2021. « Advances and challenges in time-resolved macromolecular crystallography ». *Science* 373(6558): eaba0954. doi:10.1126/science.aba0954.
- Brives, Charlotte, et Jessica Pourraz. 2020. « Phage Therapy as a Potential Solution in the Fight against AMR: Obstacles and Possible Futures ». *Palgrave Communications* 6(1): 1-11. doi:10.1057/s41599-020-0478-4.
- Burata, Olive E., Trevor Justin Yeh, Christian B. Macdonald, et Randy B. Stockbridge. 2022. « Still rocking in the structural era: A molecular overview of the small multidrug resistance (SMR) transporter family ». *The Journal of Biological Chemistry* 298(10): 102482. doi:10.1016/j.jbc.2022.102482.
- Callaway, Ewen. 2024. « These ‘Movies’ of Proteins in Action Are Revealing the Hidden Biology of Cells ». *Nature* 627(8004): 480-82. doi:10.1038/d41586-024-00817-y.
- 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. doi:10.1016/j.str.2012.08.026.
- Caramello, N., et A. Royant. 2024. « From Femtoseconds to Minutes: Time-Resolved Macromolecular Crystallography at XFELs and Synchrotrons ». *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 80(2): 60-79. doi:10.1107/S2059798323011002.
- Cardone, Giovanni, J. Bernard Heymann, et Alasdair C. Steven. 2013. « One number does not fit all: mapping local variations in resolution in cryo-EM reconstructions ». *Journal of structural biology* 184(2): 10.1016/j.jsb.2013.08.002. doi:10.1016/j.jsb.2013.08.002.
- Carter, Eric L., Lindsey Jager, Lars Gardner, Christel C. Hall, Stacey Willis, et Jacalyn M. Green. 2007. « Escherichia Coli Abg Genes Enable Uptake and Cleavage of the Folate Catabolite P-Aminobenzoyl-Glutamate ». *Journal of Bacteriology* 189(9): 3329-34. doi:10.1128/JB.01940-06.
- Cf, Higgins, et Gottesman Mm. 1992. « Is the Multidrug Transporter a Flippase? » *Trends in biochemical sciences* 17(1). doi:10.1016/0968-0004(92)90419-a.
- Chakrabarti, Kalyan S., Simon Olsson, Supriya Pratihari, Karin Giller, Kerstin Overkamp, Ko On Lee, Vytautas Gapsys, et al. 2022. « A Litmus Test for Classifying Recognition Mechanisms of Transiently Binding Proteins ». *Nature Communications* 13(1): 3792. doi:10.1038/s41467-022-31374-5.
- 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. doi:10.1006/jmbi.2001.5309.
- Changeux, Jean-Pierre. 2012. « Allostery and the Monod-Wyman-Changeux Model after 50 Years ». *Annual Review of Biophysics* 41: 103-33. doi:10.1146/annurev-biophys-050511-102222.

- 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: 41751. doi: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. doi:10.1126/sciadv.abg9215.
- Chen, Chin-Yu, Yuan-Chih Chang, Bo-Lin Lin, Chun-Hsiang Huang, et Ming-Daw Tsai. 2019. « Temperature-Resolved Cryo-EM Uncovers Structural Bases of Temperature-Dependent Enzyme Functions ». *Journal of the American Chemical Society* 141(51): 19983-87. doi:10.1021/jacs.9b10687.
- Chen, Jue, Gang Lu, Jeffrey Lin, Amy L. Davidson, et Florante A. Quioco. 2003. « A Tweezers-like Motion of the ATP-Binding Cassette Dimer in an ABC Transport Cycle ». *Molecular Cell* 12(3): 651-61. doi:10.1016/j.molcel.2003.08.004.
- Chen, Jue, Susan Sharma, Florante A. Quioco, et Amy L. Davidson. 2001. « Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4): 1525-30.
- Chen, Muyuan, et Steven J. Ludtke. 2021. « Deep Learning-Based Mixed-Dimensional Gaussian Mixture Model for Characterizing Variability in Cryo-EM ». *Nature Methods* 18(8): 930-36. doi:10.1038/s41592-021-01220-5.
- Chevalier, Sylvie, Emeline Bouffartigues, Josselin Bodilis, Olivier Maillot, Olivier Lesouhaitier, Marc G. J. Feuilloley, Nicole Orange, Alain Dufour, et Pierre Cornelis. 2017. « Structure, Function and Regulation of Pseudomonas Aeruginosa Porins ». *FEMS microbiology reviews* 41(5): 698-722. doi:10.1093/femsre/fux020.
- Cho, Hyun Sun, Friedrich Schotte, Valentyn Stadnytskyi, et Philip Anfinrud. 2021. « Time-resolved X-ray Scattering Studies of Proteins ». *Current opinion in structural biology* 70: 99-107. doi:10.1016/j.sbi.2021.05.002.
- Choudhury, Hassanul G., Zhen Tong, Indran Mathavan, Yanyan Li, So Iwata, Séverine Zirah, Sylvie Rebuffat, Hendrik W. van Veen, et Konstantinos Beis. 2014. « Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(25): 9145-50. doi:10.1073/pnas.1320506111.
- « Classification of Liposomes - Creative Biolabs ». <https://www.creative-biolabs.com/lipid-based-delivery/classification-of-liposomes.htm> (2 septembre 2024).
- Cole, Susan P. C. 2014. « Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(45): 30880-88. doi:10.1074/jbc.R114.609248.
- Cox, Georgina, Gary S. Thompson, Huw T. Jenkins, Frank Peske, Andreas Savelsbergh, Marina V. Rodnina, Wolfgang Wintermeyer, et al. 2012. « Ribosome Clearance by FusB-Type Proteins Mediates Resistance to the Antibiotic Fusidic Acid ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(6): 2102-7. doi:10.1073/pnas.1117275109.
- Dadgostar, Porooshat. 2019. « Antimicrobial Resistance: Implications and Costs ». *Infection and Drug Resistance* 12: 3903-10. doi:10.2147/IDR.S234610.
- 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. doi:10.1021/bi0482809.
- Damm, Alicia. 2019. « Interplay between the Conformational Dynamics of a Transmembrane Protein and the Mechanical Properties of Its Surrounding Membrane ». phdthesis. Sorbonne Université. <https://theses.hal.science/tel-03330142> (27 juin 2024).
- Damm, Alicia, Su-Jin Paik, Raj Kumar Sadhu, Aurélie Di-Cicco, John Manzi, Michele Castellana, Emmanuel Margeat, et al. 2024. « Mechanosensitivity of an ABC Membrane Transporter Revealed by Single Molecule FRET and Activity Measurement ». : 2024.01.24.577054. doi:10.1101/2024.01.24.577054.
- Dandey, Venkata P., William C. Budell, Hui Wei, Daija Bobe, Kashyap Maruthi, Mykhailo Kopylov, Edward T. Eng, et al. 2020. « Time-Resolved Cryo-EM Using Spotiton ». *Nature Methods* 17(9): 897-900. doi:10.1038/s41592-020-0925-6.
- Darby, Elizabeth M., Eleftheria Trampari, Pauline Siasat, Maria Solsona Gaya, Ilyas Alav, Mark A. Webber, et Jessica M. A. Blair. 2023. « Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited ». *Nature Reviews Microbiology* 21(5): 280-95. doi:10.1038/s41579-022-00820-y.
- Davidson, Amy L., Elie Dassa, Cedric Orelle, et Jue Chen. 2008. « Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems ». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 72(2): 317-64, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00031-07.
- 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. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.073.
- De Gaetano, Giuseppe Valerio, Germana Lentini, Agata Famà, Francesco Coppolino, et Concetta Beninati. 2023. « Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps ». *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 12(6): 965. doi:10.3390/antibiotics12060965.
- Delmar, Jared A., et Edward W. Yu. 2016. « The AbgT Family: A Novel Class of Antimetabolite Transporters ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 25(2): 322-37. doi:10.1002/pro.2820.
- Deng, Wanyan, Chunmei Li, et Jianping Xie. 2013. « The underling mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors ». *Cellular Signalling* 25(7): 1608-13. doi:10.1016/j.cellsig.2013.04.003.

- Di Cesare, Margot, Elise Kaplan, Julia Rendon, Guillaume Gerbaud, Sepideh Valimehr, Alexia Gobet, Thu-Anh Thi Ngo, et al. 2024. « The Transport Activity of the Multidrug ABC Transporter BmrA Does Not Require a Wide Separation of the Nucleotide-Binding Domains ». *The Journal of Biological Chemistry* 300(1): 105546. doi:10.1016/j.jbc.2023.105546.
- Ding, Feng, Kerry J. Lee, Ardeschir Vahedi-Faridi, Tao Huang, et Xiao-Hong Nancy Xu. 2011. « Design and Probing of Efflux Functions of EGFP Fused ABC Membrane Transporters in Live Cells Using Fluorescence Spectroscopy ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(1): 223-35. doi:10.1007/s00216-011-4727-7.
- Do Cao, Marie-Ange, Serge Crouzy, Miyeon Kim, Michel Becchi, David S. Cafiso, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2009. « Probing the Conformation of the Resting State of a Bacterial Multidrug ABC Transporter, BmrA, by a Site-Directed Spin Labeling Approach ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 18(7): 1507-20. doi:10.1002/pro.141.
- Doi, Yohei, Jun-Ichi Wachino, et Yoshichika Arakawa. 2016. « Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases ». *Infectious Disease Clinics of North America* 30(2): 523-37. doi:10.1016/j.idc.2016.02.011.
- Doktorova, Milka, Frederick A. Heberle, Barbara Eicher, Robert F. Standaert, John Katsaras, Erwin London, Georg Pabst, et Drew Marquardt. 2018. « Preparation of Asymmetric Phospholipid Vesicles: The next Generation of Cell Membrane Models ». *Nature protocols* 13(9): 2086. doi:10.1038/s41596-018-0033-6.
- Draper, P. 1998. « The Outer Parts of the Mycobacterial Envelope as Permeability Barriers ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 3: D1253-1261. doi:10.2741/a360.
- Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, et P. Schultz. 1988. « Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 21(2): 129-228. doi:10.1017/s0033583500004297.
- Earl, Ashlee M., Richard Losick, et Roberto Kolter. 2008. « Ecology and genomics of *Bacillus subtilis* ». *Trends in microbiology* 16(6): 269. doi:10.1016/j.tim.2008.03.004.
- Eckford, Paul D. W., et Frances J. Sharom. 2008. « Functional Characterization of *Escherichia coli* MsbA ». *Journal of Biological Chemistry* 283(19): 12840-50. doi:10.1074/jbc.M708274200.
- Ellinghaus, Thomas L., Thomas Marcellino, Vasundara Srinivasan, Roland Lill, et Werner Kühlbrandt. 2021. « Conformational changes in the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1 during the transport cycle ». *Science Advances* 7(52): eabk2392. doi:10.1126/sciadv.abk2392.
- Ellis-Davies, Graham C R. 2007. « Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology ». *Nature methods* 4(8): 619-28. doi:10.1038/nmeth1072.
- Engstrom, Tyler, Jonathan A. Clinger, Katherine A. Spoth, Oliver B. Clarke, David S. Closs, Richard Jayne, Benjamin A. Apker, et Robert E. Thorne. 2021. « High-resolution

- single-particle cryo-EM of samples vitrified in boiling nitro-gen ». *IUCrJ* 8(Pt 6): 867-77. doi:10.1107/S2052252521008095.
- Fan, Chengcheng, Jens T. Kaiser, et Douglas C. Rees. 2020. « A structural framework for unidirectional transport by a bacterial ABC exporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(32): 19228-36. doi:10.1073/pnas.2006526117.
- Feng, Xiangsong, Ziao Fu, Sandip Kaledhonkar, Yuan Jia, Binita Shah, Amy Jin, Zheng Liu, et al. 2017. « A Fast and Effective Microfluidic Spraying-Plunging Method for High-Resolution Single-Particle Cryo-EM ». *Structure* 25(4): 663-670.e3. doi:10.1016/j.str.2017.02.005.
- Fisette, Olivier, Patrick Lagüe, Stéphane Gagné, et Sébastien Morin. 2012. « Synergistic Applications of MD and NMR for the Study of Biological Systems ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 254208. doi:10.1155/2012/254208.
- Fj, Sharom. 2014. « Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function ». *Frontiers in oncology* 4. doi:10.3389/fonc.2014.00041.
- Frank, J. 1975. « Averaging of Low Exposure Electron Micrographs of Non-Periodic Objects ». *Ultramicroscopy* 1(2): 159-62. doi:10.1016/s0304-3991(75)80020-9.
- Frank, Joachim, et Abbas Ourmazd. 2016. « Continuous Changes in Structure Mapped by Manifold Embedding of Single-Particle Data in Cryo-EM ». *Methods (San Diego, Calif.)* 100: 61-67. doi:10.1016/j.ymeth.2016.02.007.
- 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. doi:10.1016/j.jmb.2014.03.002.
- Fu, Ziao, Sandip Kaledhonkar, Anneli Borg, Ming Sun, Bo Chen, Robert A. Grassucci, Mans Ehrenberg, et Joachim Frank. 2016. « Key intermediates in ribosome recycling visualized by time-resolved cryo-electron microscopy ». *Structure (London, England : 1993)* 24(12): 2092-2101. doi:10.1016/j.str.2016.09.014.
- Furukawa-Hagiya, Tomoka, Tadaomi Furuta, Shuntaro Chiba, Yoshiro Sohma, et Minoru Sakurai. 2013. « The Power Stroke Driven by ATP Binding in CFTR as Studied by Molecular Dynamics Simulations ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 117(1): 83-93. doi:10.1021/jp308315w.
- Furuta, Tadaomi, Tomohiro Yamaguchi, Hiroaki Kato, et Minoru Sakurai. 2014. « Analysis of the Structural and Functional Roles of Coupling Helices in the ATP-Binding Cassette Transporter MsbA through Enzyme Assays and Molecular Dynamics Simulations ». *Biochemistry* 53(26): 4261-72. doi:10.1021/bi500255j.
- Garavito, R. Michael, et Shelagh Ferguson-Miller. 2001. « Detergents as Tools in Membrane Biochemistry* ». *Journal of Biological Chemistry* 276(35): 32403-6. doi:10.1074/jbc.R100031200.

- Gaurav, Amit, Perwez Bakht, Mahak Saini, Shivam Pandey, et Ranjana Pathania. 2023. « Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors ». *Microbiology* 169(5): 001333. doi:10.1099/mic.0.001333.
- Gayen, Anindita, Maureen Leninger, et Nathaniel J. Traaseth. 2016. « Protonation of a Glutamate Residue Modulates the Dynamics of the Drug Transporter EmrE ». *Nature Chemical Biology* 12(3): 141-45. doi:10.1038/nchembio.1999.
- Gbelska, Yvetta, Jorrit-Jan Krijger, et Karin D. Breunig. 2006. « Evolution of Gene Families: The Multidrug Resistance Transporter Genes in Five Related Yeast Species ». *FEMS yeast research* 6(3): 345-55. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00058.x.
- Geertsma, Eric R., N. a. B. Nik Mahmood, Gea K. Schuurman-Wolters, et Bert Poolman. 2008. « Membrane Reconstitution of ABC Transporters and Assays of Translocator Function ». *Nature Protocols* 3(2): 256-66. doi:10.1038/nprot.2007.519.
- Gewering, Theresa, Deepali Waghay, Kristian Parey, Hendrik Jung, Nghi NB Tran, Joel Zapata, Pengyi Zhao, et al. 2024. « Tracing the substrate translocation mechanism in P-glycoprotein » éd. David Drew et Merritt Maduke. *eLife* 12: RP90174. doi:10.7554/eLife.90174.
- Göddeke, Hendrik, et Lars V. Schäfer. 2020. « Capturing Substrate Translocation in an ABC Exporter at the Atomic Level ». *Journal of the American Chemical Society* 142(29): 12791-801. doi:10.1021/jacs.0c05502.
- Godoy-Hernandez, Albert, Amer H. Asseri, Aiden J. Purugganan, Chimari Jiko, Carol de Ram, Holger Lill, Martin Pabst, et al. 2023. « Rapid and Highly Stable Membrane Reconstitution by LAiR Enables the Study of Physiological Integral Membrane Protein Functions ». *ACS Central Science* 9(3): 494-507. doi:10.1021/acscentsci.2c01170.
- Graham, David W., Gilles Bergeron, Megan W. Bourassa, James Dickson, Filomena Gomes, Adina Howe, Laura H. Kahn, et al. 2019. « Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1441(1): 17-30. doi:10.1111/nyas.14036.
- Gulati, Sonali, Mohammed Jamshad, Timothy J. Knowles, Kerrie A. Morrison, Rebecca Downing, Natasha Cant, Richard Collins, et al. 2014. « Detergent-Free Purification of ABC (ATP-Binding-Cassette) Transporters ». *The Biochemical Journal* 461(2): 269-78. doi:10.1042/BJ20131477.
- Guo, Youzhong. 2021. « Detergent-free systems for structural studies of membrane proteins ». *Biochemical Society transactions* 49(3): 1361-74. doi:10.1042/BST20201080.
- Gutmann, Daniel A. P., Andrew Ward, Ina L. Urbatsch, Geoffrey Chang, et Hendrik W. van Veen. 2010. « Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1 ». *Trends in biochemical sciences* 35(1): 36-42. doi:10.1016/j.tibs.2009.07.009.

- Haglund, Richard F. 2007. « Time and Space-Resolved Spectroscopy ». In *Laser Ablation and Its Applications*, éd. Claude Phipps. Boston, MA: Springer US, 185-213. doi:10.1007/978-0-387-30453-3_8.
- Haran, Gilad, et Inbal Riven. 2023. « Perspective: How Fast Dynamics Affect Slow Function in Protein Machines ». *The Journal of Physical Chemistry B* 127(21): 4687-93. doi:10.1021/acs.jpcc.3c00705.
- Harder, Oliver F., Sarah V. Barrass, Marcel Drabbels, et Ulrich J. Lorenz. 2023. « Fast Viral Dynamics Revealed by Microsecond Time-Resolved Cryo-EM ». *Nature Communications* 14(1): 5649. doi:10.1038/s41467-023-41444-x.
- 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): 450-54. doi:10.1016/j.resmic.2018.01.001.
- Hassan, Karl A., Qi Liu, Peter J. F. Henderson, et Ian T. Paulsen. 2015. « Homologs of the *Acinetobacter Baumannii* AceI Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems ». *mBio* 6(1): e01982-14. doi:10.1128/mBio.01982-14.
- Hassan, Karl A., Varsha Naidu, Jacob R. Edgerton, Karla A. Mettrick, Qi Liu, Leila Fahmy, Liping Li, et al. 2019. « Short-Chain Diamines Are the Physiological Substrates of PACE Family Efflux Pumps ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(36): 18015-20. doi:10.1073/pnas.1901591116.
- van Heel, M., et J. Frank. 1981. « Use of Multivariate Statistics in Analysing the Images of Biological Macromolecules ». *Ultramicroscopy* 6(2): 187-94. doi:10.1016/0304-3991(81)90059-0.
- Henderson, R., et P. N. Unwin. 1975. « Three-Dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy ». *Nature* 257(5521): 28-32. doi:10.1038/257028a0.
- Hendrickson, Wayne A. 2016. « Atomic-Level Analysis of Membrane-Protein Structure ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23(6): 464-67. doi:10.1038/nsmb.3215.
- Henzler-Wildman, Katherine, et Dorothee Kern. 2007. « Dynamic Personalities of Proteins ». *Nature* 450(7172): 964-72. doi:10.1038/nature06522.
- Hevekerl, Heike, Johan Tornmalm, et Jerker Widengren. 2016. « Fluorescence-Based Characterization of Non-Fluorescent Transient States of Tryptophan – Prospects for Protein Conformation and Interaction Studies ». *Scientific Reports* 6(1): 35052. doi:10.1038/srep35052.
- Heymann, J. Bernard, James F. Conway, et Alasdair C. Steven. 2004. « Molecular Dynamics of Protein Complexes from Four-Dimensional Cryo-Electron Microscopy ». *Journal of Structural Biology* 147(3): 291-301. doi:10.1016/j.jsb.2004.02.006.
- Higgins, C. F. 1992. « ABC Transporters: From Microorganisms to Man ». *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113. doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.

- Higgins, Christopher F., et Kenneth J. Linton. 2004. « The ATP Switch Model for ABC Transporters ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11(10): 918-26. doi:10.1038/nsmb836.
- Higgins, Matthew K. 2021. « Can We AlphaFold Our Way Out of the Next Pandemic? » *Journal of Molecular Biology* 433(20): 167093. doi:10.1016/j.jmb.2021.167093.
- Hoffmann, Lea, Anika Baier, Lara Jorde, Michael Kamel, Jan-Hannes Schäfer, Kilian Schnelle, Alischa Scholz, et al. 2024. « The ABC Transporter MsbA in a Dozen Environments ». : 2024.06.20.599867. doi:10.1101/2024.06.20.599867.
- 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. doi:10.1038/s41586-019-1391-0.
- Holland, I. Barry, Susan P. C. Cole, Karl Kuchler, et Christopher F. Higgins. 2003. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. Elsevier.
- Hu, Wenxin, Chance Parkinson, et Hongjin Zheng. 2024. « Mechanistic Insights Revealed by YbtPQ in the Occluded State ». *Biomolecules* 14(3): 322. doi:10.3390/biom14030322.
- Hutter, Cedric A. J., M. Hadi Timachi, Lea M. Hürlimann, Iwan Zimmermann, Pascal Egloff, Hendrik Göttsche, Svetlana Kucher, et al. 2019. « The Extracellular Gate Shapes the Energy Profile of an ABC Exporter ». *Nature Communications* 10(1): 2260. doi:10.1038/s41467-019-09892-6.
- Jain, Tilak, Patrick Sheehan, John Crum, Bridget Carragher, et Clinton S. Potter. 2012. « Spotiton: A prototype for an integrated inkjet dispense and vitrification system for cryo-TEM ». *Journal of Structural Biology* 179(1): 68-75. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.020.
- Jamshad, Mohammed, Yu-Pin Lin, Timothy J. Knowles, Rosemary A. Parslow, Craig Harris, Mark Wheatley, David R. Poyner, et al. 2011. « Surfactant-Free Purification of Membrane Proteins with Intact Native Membrane Environment ». *Biochemical Society Transactions* 39(3): 813-18. doi:10.1042/BST0390813.
- Janas, Eva, Matthias Hofacker, Min Chen, Simone Gompf, Chris van der Does, et Robert Tampé. 2003. « The ATP Hydrolysis Cycle of the Nucleotide-Binding Domain of the Mitochondrial ATP-Binding Cassette Transporter Mdl1p ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(29): 26862-69. doi:10.1074/jbc.M301227200.
- Janulienė, Dovile, et Arne Moeller. 2020. « Cryo-EM of ABC Transporters: An Ice-Cold Solution to Everything? » *FEBS Letters* 594(23): 3776-89. doi:10.1002/1873-3468.13989.
- Jardetzky, O. 1966. « Simple Allosteric Model for Membrane Pumps ». *Nature* 211(5052): 969-70. doi:10.1038/211969a0.
- Javed, Waqas. 2020. « Study of the Conformational States of a Bacterial Multidrug ABC Transporter BmrA ». phdthesis. Université Grenoble Alpes [2020-....]. <https://theses.hal.science/tel-03362700> (27 août 2024).

- Javed, Waqas, Sylvain Vallet, Marie-Pierre Clement, Aline Le Roy, Martine Moulin, Michael Härtleln, 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. doi:10.1016/j.jmb.2022.167541.
- Jiang, Xiaoxu, Natalia Ermolova, John Lim, Seo Woo Choi, et H. Ronald Kaback. 2020. « The Proton Electrochemical Gradient Induces a Kinetic Asymmetry in the Symport Cycle of LacY ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(2): 977-81. doi:10.1073/pnas.1916563117.
- Johansen, Nicolai Tidemand, Frederik Grønbæk Tidemand, Martin Cramer Pedersen, et Lise Arleth. 2023. « Travel light: Essential packing for membrane proteins with an active lifestyle ». *Biochimie* 205: 3-26. doi:10.1016/j.biochi.2022.07.014.
- Jones, C. M., A. Ansari, E. R. Henry, G. W. Christoph, J. Hofrichter, et W. A. Eaton. 1992. « Speed of Intersubunit Communication in Proteins ». *Biochemistry* 31(29): 6692-6702. doi:10.1021/bi00144a008.
- 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. doi:10.1002/prot.22250.
- Jones, Peter M., et Anthony M. George. 2023. « The Switch and Reciprocating Models for the Function of ABC Multidrug Exporters: Perspectives on Recent Research ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2624. doi:10.3390/ijms24032624.
- Josts, Inokentij, Yunyun Gao, Diana C. F. Monteiro, Stephan Niebling, Julius Nitsche, Katharina Veith, Tobias W. Gräwert, et al. 2020. « Structural Kinetics of MsbA Investigated by Stopped-Flow Time-Resolved Small-Angle X-Ray Scattering ». *Structure (London, England: 1993)* 28(3): 348-354.e3. doi:10.1016/j.str.2019.12.001.
- Kaledhonkar, Sandip, Ziao Fu, Howard White, et Joachim Frank. 2018. « Time-Resolved Cryo-Electron Microscopy Using a Microfluidic Chip ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1764: 59-71. doi:10.1007/978-1-4939-7759-8_4.
- Kartner, N., J. R. Riordan, et V. Ling. 1983. « Cell Surface P-Glycoprotein Associated with Multidrug Resistance in Mammalian Cell Lines ». *Science (New York, N.Y.)* 221(4617): 1285-88. doi:10.1126/science.6137059.
- Karuppasamy, Manikandan, Fatemeh Karimi Nejadasl, Milos Vulovic, Abraham J. Koster, et Raimond B. G. Ravelli. 2011. « Radiation damage in single-particle cryo-electron microscopy: effects of dose and dose rate ». *Journal of Synchrotron Radiation* 18(Pt 3): 398-412. doi:10.1107/S090904951100820X.
- Kasas, S., G. Dumas, G. Dietler, S. Catsicas, et M. Adrian. 2003. « Vitrification of Cryoelectron Microscopy Specimens Revealed by High-Speed Photographic Imaging ». *Journal of Microscopy* 211(Pt 1): 48-53. doi:10.1046/j.1365-2818.2003.01193.x.
- Kawale, Ashish A., et Björn M. Burmann. 2021. « Characterization of backbone dynamics using solution NMR spectroscopy to discern the functional plasticity of structurally analogous proteins ». *STAR Protocols* 2(4): 100919. doi:10.1016/j.xpro.2021.100919.

- Khunweeraphong, Narakorn, Thomas Stockner, et Karl Kuchler. 2017. « The Structure of the Human ABC Transporter ABCG2 Reveals a Novel Mechanism for Drug Extrusion ». *Scientific Reports* 7(1): 13767. doi:10.1038/s41598-017-11794-w.
- Kiel, Michael C., Hideko Kaji, et Akira Kaji. 2007. « Ribosome Recycling: An Essential Process of Protein Synthesis ». *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 35(1): 40-44. doi:10.1002/bmb.6.
- Klebl, David P., Louie Aspinall, et Stephen P. Muench. 2023. « Time resolved applications for Cryo-EM; approaches, challenges and future directions ». *Current Opinion in Structural Biology* 83: 102696. doi:10.1016/j.sbi.2023.102696.
- Klindt, David A., Aapo Hyvärinen, Axel Levy, Nina Miolane, et Frédéric Poitevin. 2024. « Towards Interpretable Cryo-EM: Disentangling Latent Spaces of Molecular Conformations ». : 2024.03.18.585544. doi:10.1101/2024.03.18.585544.
- Kmiecik, Sebastian, Dominik Gront, Michal Kolinski, Lukasz Wieteska, Aleksandra Elzbieta Dawid, et Andrzej Kolinski. 2016. « Coarse-Grained Protein Models and Their Applications ». *Chemical Reviews* 116(14): 7898-7936. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00163.
- Kobayashi, N., K. Nishino, et A. Yamaguchi. 2001. « Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in Escherichia Coli ». *Journal of Bacteriology* 183(19): 5639-44. doi:10.1128/JB.183.19.5639-5644.2001.
- Kovermann, Michael, Per Rogne, et Magnus Wolf-Watz. 2016. « Protein Dynamics and Function from Solution State NMR Spectroscopy ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 49: e6. doi:10.1017/S0033583516000019.
- 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. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02143.x.
- Krüger, Constantin R., Nathan J. Mowry, Marcel Drabbels, et Ulrich J. Lorenz. 2024. « Shaped Laser Pulses for Microsecond Time-Resolved Cryo-EM: Outrunning Crystallization during Flash Melting ». *The Journal of Physical Chemistry Letters* 15(16): 4244-48. doi:10.1021/acs.jpcllett.4c00315.
- Kühlbrandt, Werner. 2014. « The Resolution Revolution ». *Science* 343(6178): 1443-44. doi:10.1126/science.1251652.
- Kuroda, Teruo, et Tomofusa Tsuchiya. 2009. « Multidrug Efflux Transporters in the MATE Family ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794(5): 763-68. doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.012.
- Kusakizako, Tsukasa, Hirotake Miyauchi, Ryuichiro Ishitani, et Osamu Nureki. 2020. « Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862(12): 183154. doi:10.1016/j.bbamem.2019.183154.

- Lacabanne, Denis, Cédric Orelle, Lauriane Lecoq, Britta Kunert, Claire Chuilon, Thomas Wiegand, Stéphanie Ravaud, et al. 2019. « Flexible-to-Rigid Transition Is Central for Substrate Transport in the ABC Transporter BmrA from *Bacillus Subtilis* ». *Communications Biology* 2(1): 1-9. doi: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. doi:10.1021/jacs.2c04287.
- Lacabanne, Denis, Thomas Wiegand, Nino Wili, Maria I. Kozlova, Riccardo Cadalbert, Daniel Klose, Armen Y. Mulikidjanian, Beat H. Meier, et Anja Böckmann. 2020. « ATP Analogues for Structural Investigations: Case Studies of a DnaB Helicase and an ABC Transporter ». *Molecules* 25(22): 5268. doi:10.3390/molecules25225268.
- Lanyi, J. K. 1995. « Bacteriorhodopsin as a Model for Proton Pumps ». *Nature* 375(6531): 461-63. doi:10.1038/375461a0.
- Lanyi, Janos K. 2000. « Molecular Mechanism of Ion Transport in Bacteriorhodopsin: Insights from Crystallographic, Spectroscopic, Kinetic, and Mutational Studies ». *The Journal of Physical Chemistry B* 104(48): 11441-48. doi:10.1021/jp0023718.
- Le Bon, Christel, Baptiste Michon, Jean-Luc Popot, et M. Zoonens. 2021. « Amphipathic environments for determining the structure of membrane proteins by single-particle electron cryo-microscopy ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 54: e6. doi:10.1017/S0033583521000044.
- Levental, Ilya, et Ed Lyman. 2023. « Regulation of Membrane Protein Structure and Function by Their Lipid Nano-Environment ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 24(2): 107-22. doi:10.1038/s41580-022-00524-4.
- Lewandowski, Józef R., Meghan E. Halse, Martin Blackledge, et Lyndon Emsley. 2015. « Direct observation of hierarchical protein dynamics ». *Science* 348(6234): 578-81. doi:10.1126/science.aaa6111.
- Lige, Tonggu, et Ligu Wang. 2020. « Cryo-EM sample preparation method for extremely low concentration liposomes ». *Ultramicroscopy* 208: 112849. doi:10.1016/j.ultramic.2019.112849.
- Linton, Kenneth J., et Christopher F. Higgins. 1998. « The Escherichia Coli ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins ». *Molecular Microbiology* 28(1): 5-13. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00764.x.
- Lombardo, Domenico, et Mikhail A. Kiselev. 2022. « Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application ». *Pharmaceutics* 14(3): 543. doi:10.3390/pharmaceutics14030543.
- Loo, Tip W., M. Claire Bartlett, et David M. Clarke. 2013. « Human P-Glycoprotein Contains a Greasy Ball-and-Socket Joint at the Second Transmission Interface ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(28): 20326-33. doi:10.1074/jbc.M113.484550.

- Lu, Zonghuan, Jay McMahon, Hisham Mohamed, David Barnard, Tanvir R. Shaikh, Carmen A. Mannella, Terence Wagenknecht, et Toh-Ming Lu. 2010. « Passive microfluidic device for submillisecond mixing ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 144(1): 301-9. doi:10.1016/j.snb.2009.10.036.
- Lu, Zonghuan, Tanvir R. Shaikh, David Barnard, Xing Meng, Hisham Mohamed, Aymen Yassin, Carmen A. Mannella, et al. 2009. « Monolithic microfluidic mixing–spraying devices for time-resolved cryo-electron microscopy ». *Journal of Structural Biology* 168(3): 388-95. doi:10.1016/j.jsb.2009.08.004.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, et J. E. Hearst. 1993. « Molecular Cloning and Characterization of *acrA* and *acrE* Genes of *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 175(19): 6299-6313. doi:10.1128/jb.175.19.6299-6313.1993.
- Maag, Denis, Thilo Mast, Marcus Elstner, Qiang Cui, et Tomáš Kubař. 2021. « O to bR transition in bacteriorhodopsin occurs through a proton hole mechanism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(39): e2024803118. doi:10.1073/pnas.2024803118.
- Mäeots, Märt Erik, et Radoslav I. Enchev. 2022. « Structural Dynamics: Review of Time-Resolved Cryo-EM ». *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology* 78(Pt 8): 927-35. doi:10.1107/S2059798322006155.
- Mäeots, Märt-Erik, Byungjin Lee, Andrea Nans, Seung-Geun Jeong, Mohammad M. N. Esfahani, Shan Ding, Daniel J. Smith, et al. 2020. « Modular Microfluidics Enables Kinetic Insight from Time-Resolved Cryo-EM ». *Nature Communications* 11(1): 3465. doi:10.1038/s41467-020-17230-4.
- Mandal, Paulami, Munmun Bardhan, et Tapan Ganguly. 2010. « A detailed spectroscopic study on the interaction of Rhodamine 6G with human hemoglobin ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 99(2): 78-86. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.02.009.
- Manuse, Sylvie, Yue Shan, Silvia J. Canas-Duarte, Somenath Bakshi, Wei-Sheng Sun, Hirotada Mori, Johan Paulsson, et Kim Lewis. 2021. « Bacterial Persisters Are a Stochastically Formed Subpopulation of Low-Energy Cells ». *PLOS Biology* 19(4): e3001194. doi:10.1371/journal.pbio.3001194.
- Marger, M. D., et M. H. Saier. 1993. « A Major Superfamily of Transmembrane Facilitators That Catalyze Uniport, Symport and Antiport ». *Trends in Biochemical Sciences* 18(1): 13-20. doi:10.1016/0968-0004(93)90081-w.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0018036.
- Mazal, Hisham, et Gilad Haran. 2019. « Single-molecule FRET methods to study the dynamics of proteins at work ». *Current opinion in biomedical engineering* 12: 8-17. doi:10.1016/j.cobme.2019.08.007.

- Mi, Wei, Yanyan Li, Sung Hwan Yoon, Robert K. Ernst, Thomas Walz, et Maofu Liao. 2017. « Structural Basis of MsbA-Mediated Lipopolysaccharide Transport ». *Nature* 549(7671): 233-37. doi:10.1038/nature23649.
- Mishra, Nagendra N., Arnold S. Bayer, Truc T. Tran, Yousif Shamoo, Eugenia Mileykovskaya, William Dowhan, Ziqiang Guan, et Cesar A. Arias. 2012. « Daptomycin Resistance in Enterococci Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content ». *PloS One* 7(8): e43958. doi:10.1371/journal.pone.0043958.
- Mittal, Anshumali, Simon Böhm, Markus G. Grütter, Enrica Bordignon, et Markus A. Seeger. 2012. « Asymmetry in the Homodimeric ABC Transporter MsbA Recognized by a DARPIn * ». *Journal of Biological Chemistry* 287(24): 20395-406. doi:10.1074/jbc.M112.359794.
- Monod, J., J. Wyman, et J. P. Changeux. 1965. « ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL ». *Journal of Molecular Biology* 12: 88-118. doi:10.1016/s0022-2836(65)80285-6.
- Montaño Romero, A., C. Bonin, et E. C. Twomey. 2024. « C-SPAM: An Open-Source Time-Resolved Specimen Vitrification Device with Light-Activated Molecules ». *IUCrJ* 11(1): 16-22. doi:10.1107/S2052252523010308.
- Monteiro, Diana C. F., Emmanuel Amoah, Cromarte Rogers, et Arwen R. Pearson. 2021. « Using Photocaging for Fast Time-Resolved Structural Biology Studies ». *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology* 77(Pt 10): 1218-32. doi:10.1107/S2059798321008809.
- 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.
- Murray, Christopher J L, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. « Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis ». *The Lancet* 399(10325): 629-55. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Muth, T.R., et S. Schuldiner. 2000. « A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE ». *The EMBO Journal* 19(2): 234-40. doi:10.1093/emboj/19.2.234.
- Nakatani, Ryo J., Masahiro Itabashi, Takahiro G. Yamada, Noriko F. Hiroi, et Akira Funahashi. 2022. « Intercellular Interaction Mechanisms Promote Diversity in Intracellular ATP Concentration in *Escherichia Coli* Populations ». *Scientific Reports* 12(1): 17946. doi:10.1038/s41598-022-22189-x.
- Nam, Ki Hyun. 2021. « Molecular Dynamics—From Small Molecules to Macromolecules ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(7): 3761. doi:10.3390/ijms22073761.
- Nam, Kwangho, et Magnus Wolf-Watz. 2023. « Protein dynamics: The future is bright and complicated! ». *Structural Dynamics* 10(1): 014301. doi:10.1063/4.0000179.

- Nauman, Jess V., Phil G. Campbell, Frederick Lanni, et John L. Anderson. 2007. « Diffusion of Insulin-like Growth Factor-I and Ribonuclease through Fibrin Gels ». *Biophysical Journal* 92(12): 4444-50. doi:10.1529/biophysj.106.102699.
- Naydenova, Katerina, Peipei Jia, et Christopher J. Russo. 2020. « Cryo-EM with Sub-1 Å Specimen Movement ». *Science (New York, N.Y.)* 370(6513): 223-26. doi:10.1126/science.abb7927.
- Nazarov, Pavel A. 2022. « MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages ». *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11(6): 734. doi:10.3390/antibiotics11060734.
- Nepal, Krishus, Narayan Dutt Pant, Bibhusan Neupane, Ankit Belbase, Rikesh Baidhya, Ram Krishna Shrestha, Binod Lekhak, Dwij Raj Bhatta, et Bharat Jha. 2017. « Extended Spectrum Beta-Lactamase and Metallo Beta-Lactamase Production among Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae Isolated from Different Clinical Samples in a Tertiary Care Hospital in Kathmandu, Nepal ». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16(1): 62. doi:10.1186/s12941-017-0236-7.
- Neutze, Richard, Eva Pebay-Peyroula, Karl Edman, Antoine Royant, Javier Navarro, et Ehud M. Landau. 2002. « Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565(2): 144-67. doi:10.1016/S0005-2736(02)00566-7.
- 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. doi:10.1002/anie.201713395.
- Nishino, Kunihiko, Junko Yamada, Hidetada Hirakawa, Takahiro Hirata, et Akihito Yamaguchi. 2003. « Roles of TolC-Dependent Multidrug Transporters of Escherichia Coli in Resistance to Beta-Lactams ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(9): 3030-33. doi:10.1128/AAC.47.9.3030-3033.2003.
- Noble, Alex J, Venkata P Dandey, Hui Wei, Julia Brasch, Jillian Chase, Priyamvada Acharya, Yong Zi Tan, et al. 2018. « Routine single particle CryoEM sample and grid characterization by tomography » éd. Axel T Brunger. *eLife* 7: e34257. doi:10.7554/eLife.34257.
- Noble, Alex J., Hui Wei, Venkata P. Dandey, Zhening Zhang, Yong Zi Tan, Clinton S. Potter, et Bridget Carragher. 2018. « Reducing Effects of Particle Adsorption to the Air–Water Interface in Cryo-EM ». *Nature Methods* 15(10): 793-95. doi:10.1038/s41592-018-0139-3.
- Novischi, S. Y. Phoebe, Andrea Karoly-Lakatos, Kerby Chok, Christian Bonifer, Johanna Becker-Baldus, et Clemens Glaubitz. 2024. « Probing the Allosteric NBD-TMD Crosstalk in the ABC Transporter MsbA by Solid-State NMR ». *Communications Biology* 7(1): 43. doi:10.1038/s42003-023-05617-0.

- Oepen, Kristin, Veronika Mater, et Dirk Schneider. 2023. « Unfolding Individual Domains of BmrA, a Bacterial ABC Transporter Involved in Multidrug Resistance ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(6): 5239. doi:10.3390/ijms24065239.
- Okada, Ui, et Satoshi Murakami. 2022. « Structural and functional characteristics of the tripartite ABC transporter ». *Microbiology* 168(11): 001257. doi:10.1099/mic.0.001257.
- Okusu, H., D. Ma, et H. Nikaido. 1996. « AcrAB Efflux Pump Plays a Major Role in the Antibiotic Resistance Phenotype of Escherichia Coli Multiple-Antibiotic-Resistance (Mar) Mutants ». *Journal of Bacteriology* 178(1): 306-8. doi:10.1128/jb.178.1.306-308.1996.
- Omote, Hiroshi, Miki Hiasa, Takuya Matsumoto, Masato Otsuka, et Yoshinori Moriyama. 2006. « The MATE Proteins as Fundamental Transporters of Metabolic and Xenobiotic Organic Cations ». *Trends in Pharmacological Sciences* 27(11): 587-93. doi:10.1016/j.tips.2006.09.001.
- O'Neill, Jim. 2016. « Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations ». <https://amr-review.org/> (31 mai 2024).
- Orelle, Cédric, Olivier Dalmas, Philippe Gros, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2003. « 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. doi:10.1074/jbc.M308268200.
- Oswald, Christine, I. Barry Holland, et Lutz Schmitt. 2006. « The Motor Domains of ABC-Transporters. What Can Structures Tell Us? ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372(6): 385-99. doi:10.1007/s00210-005-0031-4.
- Owens, Tristan W., Rebecca J. Taylor, Karanbir Pahil, Blake Bertani, Natividad Ruiz, Andrew C. Kruse, et Daniel Kahne. 2019. « Structural basis for unidirectional export of lipopolysaccharide to the cell surface ». *Nature* 567(7749): 550-53. doi:10.1038/s41586-019-1039-0.
- Panneels, Valérie, Wenting Wu, Ching-Ju Tsai, Przemek Nogly, Jan Rheinberger, Kathrin Jaeger, Gregor Cicchetti, et al. 2015. « Time-resolved structural studies with serial crystallography: A new light on retinal proteins ». *Structural Dynamics* 2(4): 041718. doi:10.1063/1.4922774.
- Pao, Stephanie S., Ian T. Paulsen, et Milton H. Saier. 1998. « Major Facilitator Superfamily ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62(1): 1-34.
- Papasergi-Scott, Makaía M., Guillermo Pérez-Hernández, Hossein Batebi, Yang Gao, Gözde Eskici, Alpay B. Seven, Ouliana Panova, et al. 2023. « Time-Resolved Cryo-EM of G Protein Activation by a GPCR ». *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*: 2023.03.20.533387. doi:10.1101/2023.03.20.533387.
- Parcej, David, et Robert Tampé. 2010. « ABC Proteins in Antigen Translocation and Viral Inhibition ». *Nature Chemical Biology* 6(8): 572-80. doi:10.1038/nchembio.410.

- Penczek, P. A., J. Zhu, et J. Frank. 1996. « A Common-Lines Based Method for Determining Orientations for $N > 3$ Particle Projections Simultaneously ». *Ultramicroscopy* 63(3-4): 205-18. doi:10.1016/0304-3991(96)00037-x.
- Punjani, Ali, et David J. Fleet. 2021. « 3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM ». *Journal of Structural Biology* 213(2): 107702. doi:10.1016/j.jsb.2021.107702.
- Punjani, Ali, et David J. Fleet. 2023. « 3DFlex: Determining Structure and Motion of Flexible Proteins from Cryo-EM ». *Nature Methods* 20(6): 860-70. doi:10.1038/s41592-023-01853-8.
- 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. doi:10.3934/biophy.2022002.
- Rapp, Mikaela, Erik Granseth, Susanna Seppälä, et Gunnar von Heijne. 2006. « Identification and Evolution of Dual-Topology Membrane Proteins ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13(2): 112-16. doi:10.1038/nsmb1057.
- Ratkeviciute, Giedre, Benjamin F. Cooper, et Timothy J. Knowles. 2021. « Methods for the solubilisation of membrane proteins: the micelle-aneous world of membrane protein solubilisation ». *Biochemical Society Transactions* 49(4): 1763-77. doi:10.1042/BST20210181.
- 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 ». *The Biochemical Journal* 395(2): 345-53. doi:10.1042/BJ20051719.
- Reck-Peterson, Samara L., Ahmet Yildiz, Andrew P. Carter, Arne Gennerich, Nan Zhang, et Ronald D. Vale. 2006. « Single-Molecule Analysis of Dynein Processivity and Stepping Behavior ». *Cell* 126(2): 335-48. doi:10.1016/j.cell.2006.05.046.
- Rigaud, J. L., B. Pitard, et D. Levy. 1995. « Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes: Application to Energy-Transducing Membrane Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1231(3): 223-46. doi:10.1016/0005-2728(95)00091-v.
- Rigaud, Jean-Louis, et Daniel Lévy. 2003. « Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes ». In *Methods in Enzymology, Liposomes, Part B*, Academic Press, 65-86. doi:10.1016/S0076-6879(03)72004-7.
- Rigaud, J.-L. 2002. « Membrane Proteins: Functional and Structural Studies Using Reconstituted Proteoliposomes and 2-D Crystals ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 35(7): 753-66. doi:10.1590/s0100-879x2002000700001.
- Rigaud, J.-L., Daniel Levy, Gervaise Mosser, et Oliver Lambert. 1998. « Detergent Removal by Non-Polar Polystyrene Beads ». *European Biophysics Journal* 27(4): 305-19. doi:10.1007/s002490050138.

- Rudolph, Michael, Robert Tampé, et Benesh Joseph. 2023. « Time-Resolved Mn²⁺ -NO and NO-NO Distance Measurements Reveal That Catalytic Asymmetry Regulates Alternating Access in an ABC Transporter ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 62(37): e202307091. doi:10.1002/anie.202307091.
- Saier, M. H., et I. T. Paulsen. 2001. « Phylogeny of Multidrug Transporters ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12(3): 205-13. doi:10.1006/scdb.2000.0246.
- Saier, M. H., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, et H. Nikaido. 1998. « Evolutionary Origins of Multidrug and Drug-Specific Efflux Pumps in Bacteria ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12(3): 265-74. doi:10.1096/fasebj.12.3.265.
- Salehi, Bahare, Zohreh Ghalavand, Abbas Yadegar, et Gita Eslami. 2021. « Characteristics and Diversity of Mutations in Regulatory Genes of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Pumps in Association with Drug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter Baumannii* ». *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 10(1): 53. doi:10.1186/s13756-021-00924-9.
- Sauna, Zuben E., In-Wha Kim, Krishnamachary Nandigama, Stephan Kopp, Peter Chiba, et Suresh V. Ambudkar. 2007. « Catalytic Cycle of ATP Hydrolysis by P-Glycoprotein: Evidence for Formation of the E·S Reaction Intermediate with ATP- γ -S, a Nonhydrolyzable Analogue of ATP ». *Biochemistry* 46(48): 13787-99. doi:10.1021/bi701385t.
- Sauna, Zuben E., Marianna Müller, Xiang-Hong Peng, et Suresh V. Ambudkar. 2002. « Importance of the Conserved Walker B Glutamate Residues, 556 and 1201, for the Completion of the Catalytic Cycle of ATP Hydrolysis by Human P-glycoprotein (ABC1) ». *Biochemistry* 41(47): 13989-0. doi:10.1021/bi026626e.
- Scarborough, Gene A. 1995. « Drug-Stimulated ATPase Activity of the Human P-Glycoprotein ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(1): 37-41. doi:10.1007/BF02110329.
- Schramm, Vern L., et Steven D. Schwartz. 2018. « Promoting Vibrations and the Function of Enzymes. Emerging Theoretical and Experimental Convergence ». *Biochemistry* 57(24): 3299-3308. doi:10.1021/acs.biochem.8b00201.
- Schultz, Kathryn M., Jacqueline A. Merten, et Candice S. Klug. 2011. « Characterization of the E506Q and H537A Dysfunctional Mutants in the E. coli ABC Transporter MsbA ». *Biochemistry* 50(18): 3599-3608. doi:10.1021/bi101666p.
- Seitz, Evan, Francisco Acosta-Reyes, Suvrajit Maji, Peter Schwander, et Joachim Frank. 2022. « Recovery of Conformational Continuum From Single-Particle Cryo-EM Images: Optimization of ManifoldEM Informed by Ground Truth ». *IEEE transactions on computational imaging* 8: 462-78. doi:10.1109/tci.2022.3174801.
- Senior, A. E., et D. C. Gadsby. 1997. « ATP Hydrolysis Cycles and Mechanism in P-Glycoprotein and CFTR ». *Seminars in Cancer Biology* 8(3): 143-50. doi:10.1006/scbi.1997.0065.

- Senior, A. E., M. K. al-Shawi, et I. L. Urbatsch. 1995. « The Catalytic Cycle of P-Glycoprotein ». *FEBS letters* 377(3): 285-89. doi:10.1016/0014-5793(95)01345-8.
- Senn, Hans Martin, et Walter Thiel. 2009. « QM/MM Methods for Biomolecular Systems ». *Angewandte Chemie International Edition* 48(7): 1198-1229. doi:10.1002/anie.200802019.
- Shea, Allyson E., Valerie S. Forsyth, Jolie A. Stocki, Taylor J. Mitchell, Arwen E. Frick-Cheng, Sara N. Smith, Sicily L. Hardy, et Harry L. T. Mobley. 2024. « Emerging roles for ABC transporters as virulence factors in uropathogenic *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121(16): e2310693121. doi:10.1073/pnas.2310693121.
- Siarheyeva, Alena, Ronghua Liu, et Frances J. Sharom. 2010. « Characterization of an Asymmetric Occluded State of P-glycoprotein with Two Bound Nucleotides ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7575-86. doi:10.1074/jbc.M109.047290.
- Siegel, D. P., J. L. Burns, M. H. Chestnut, et Y. Talmon. 1989. « Intermediates in Membrane Fusion and Bilayer/Nonbilayer Phase Transitions Imaged by Time-Resolved Cryo-Transmission Electron Microscopy ». *Biophysical Journal* 56(1): 161-69. doi:10.1016/S0006-3495(89)82661-X.
- Smirnova, Irina A., Pia Ädelroth, et Peter Brzezinski. 2018. « Extraction and Liposome Reconstitution of Membrane Proteins with Their Native Lipids without the Use of Detergents ». *Scientific Reports* 8(1): 14950. doi:10.1038/s41598-018-33208-1.
- Smriti, null, Ping Zou, et Hassane S. Mchaourab. 2009. « Mapping Daunorubicin-Binding Sites in the ATP-Binding Cassette Transporter MsbA Using Site-Specific Quenching by Spin Labels ». *The Journal of Biological Chemistry* 284(20): 13904-13. doi:10.1074/jbc.M900837200.
- Stapleton, Paul D., et Peter W. Taylor. 2002. « Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Mechanisms and Modulation ». *Science Progress* 85(Pt 1): 57-72. doi:10.3184/003685002783238870.
- Stefan, Erich, Susanne Hofmann, et Robert Tampé. 2020. « A single power stroke by ATP binding drives substrate translocation in a heterodimeric ABC transporter » éd. Sonja V Albers, Olga Boudker, Konstantinos Beis, et Dirk Slotboom. *eLife* 9: e55943. doi:10.7554/eLife.55943.
- Steinfels, 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. doi:10.1016/s0005-2736(02)00515-1.
- Steinfels, 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. doi:10.1021/bi0362018.

- Stockbridge, Randy B., et Ming-Feng Tsai. 2015. « Lipid Reconstitution and Recording of Recombinant Ion Channels ». *Methods in Enzymology* 556: 385-404. doi:10.1016/bs.mie.2014.12.028.
- Su, Chih-Chia, Jani Reddy Bolla, Nitin Kumar, Abhijith Radhakrishnan, Feng Long, Jared A. Delmar, Tsung-Han Chou, et al. 2015. « Structure and Function of Neisseria Gonorrhoeae MtrF Illuminates a Class of Antimetabolite Efflux Pumps ». *Cell Reports* 11(1): 61-70. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.003.
- Subramaniam, Sriram, Martin Lindahl, Per Bullough, A. R Faruqi, Jörg Tittor, Dieter Oesterhelt, Leonid Brown, Janos Lanyi, et Richard Henderson. 1999. « Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle1 ». *Journal of Molecular Biology* 287(1): 145-61. doi:10.1006/jmbi.1999.2589.
- Sun, Song, Maria Selmer, et Dan I. Andersson. 2014. « Resistance to β -Lactam Antibiotics Conferred by Point Mutations in Penicillin-Binding Proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in Salmonella enterica ». *PLoS ONE* 9(5): e97202. doi:10.1371/journal.pone.0097202.
- Szöllősi, Dániel, Dania Rose-Sperling, Ute A. Hellmich, et Thomas Stockner. 2018. « Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860(4): 818-32. doi:10.1016/j.bbamem.2017.10.028.
- Tan, Huan, Mojie Duan, Huayong Xie, Yongxiang Zhao, Hui Liu, Minghui Yang, Maili Liu, et Jun Yang. 2024. « Fast collective motions of backbone in transmembrane α helices are critical to water transfer of aquaporin ». *Science Advances* 10(19): eade9520. doi:10.1126/sciadv.ade9520.
- Tang, Wai Shing, Ellen D. Zhong, Sonya M. Hanson, Erik H. Thiede, et Pilar Cossio. 2023. « Conformational heterogeneity and probability distributions from single-particle cryo-electron microscopy ». *Current Opinion in Structural Biology* 81: 102626. doi:10.1016/j.sbi.2023.102626.
- Tarling, Elizabeth J., Thomas Q. de Aguiar Vallim, et Peter A. Edwards. 2013. « Role of ABC transporters in lipid transport and human disease ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24(7): 342-50. doi:10.1016/j.tem.2013.01.006.
- Theodoulou, Frederica L., et Ian D. Kerr. 2015. « ABC transporter research: going strong 40 years on ». *Biochemical Society Transactions* 43(5): 1033-40. doi:10.1042/BST20150139.
- Thomas, Christoph, et Robert Tampé. 2020. « Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters ». *Annual Review of Biochemistry* 89: 605-36. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-105201.
- Tien, Matthew Z., Austin G. Meyer, Dariya K. Sydykova, Stephanie J. Spielman, et Claus O. Wilke. 2013. « Maximum Allowed Solvent Accessibilities of Residues in Proteins ». *PLoS One* 8(11): e80635. doi:10.1371/journal.pone.0080635.
- Tiseo, Katie, Laura Huber, Marius Gilbert, Timothy P. Robinson, et Thomas P. Van Boeckel. 2020. « Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030 ». *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 9(12): 918. doi:10.3390/antibiotics9120918.

- Tivol, William F., Ariane Briegel, et Grant J. Jensen. 2008. « An Improved Cryogen for Plunge Freezing ». *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 14(5): 375-79. doi:10.1017/S1431927608080781.
- Tomczyk, Sara, Angelina Taylor, Allison Brown, Marlieke E A de Kraker, Aiman El-Saed, Majid Alshamrani, Rene S Hendriksen, et al. 2021. « Impact of the COVID-19 pandemic on the surveillance, prevention and control of antimicrobial resistance: a global survey ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76(11): 3045-58. doi:10.1093/jac/dkab300.
- Tooke, Catherine L., Philip Hinchliffe, Eilis C. Bragginton, Charlotte K. Colenso, Viivi H. A. Hirvonen, Yuiko Takebayashi, et James Spencer. 2019. « β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century ». *Journal of Molecular Biology* 431(18): 3472-3500. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- Tousignant, Audrey, et Joelle N. Pelletier. 2004. « Protein Motions Promote Catalysis ». *Chemistry & Biology* 11(8): 1037-42. doi:10.1016/j.chembiol.2004.06.007.
- Tumbic, Goran W., Md Yeathad Hossan, et Megan C. Thielges. 2021. « Protein Dynamics by Two-Dimensional Infrared Spectroscopy ». *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 14(1): 299-321. doi:10.1146/annurev-anchem-091520-091009.
- Ubarretxena-Belandia, Iban, Joyce M. Baldwin, Shimon Schuldiner, et Christopher G. Tate. 2003. « Three-Dimensional Structure of the Bacterial Multidrug Transporter EmrE Shows It Is an Asymmetric Homodimer ». *The EMBO journal* 22(23): 6175-81. doi:10.1093/emboj/cdg611.
- Unwin, Nigel, et Yoshinori Fujiyoshi. 2012. « Gating Movement of Acetylcholine Receptor Caught by Plunge-Freezing ». *Journal of Molecular Biology* 422(5): 617-34. doi:10.1016/j.jmb.2012.07.010.
- Urbatsch, Ina L., Banumathi Sankaran, Joachim Weber, et Alan E. Senior. 1995. « P-glycoprotein Is Stably Inhibited by Vanadate-induced Trapping of Nucleotide at a Single Catalytic Site (*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270(33): 19383-90. doi:10.1074/jbc.270.33.19383.
- van Veen, Hendrik W., Abelardo Margolles, Michael Müller, Christopher F. Higgins, et Wil N. Konings. 2000. « The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism ». *The EMBO Journal* 19(11): 2503-14. doi:10.1093/emboj/19.11.2503.
- Velamakanni, Saroj, Yao Yao, Daniel A. P. Gutmann, et Hendrik W. van Veen. 2008. « Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* ». *Biochemistry* 47(35): 9300-9308. doi:10.1021/bi8006737.
- Voss, Jonathan M., Oliver F. Harder, Pavel K. Olshin, Marcel Drabbels, et Ulrich J. Lorenz. 2021. « Rapid melting and revitrification as an approach to microsecond time-resolved cryo-electron microscopy ». *Chemical Physics Letters* 778: 138812. doi:10.1016/j.cplett.2021.138812.

- Wang, Ling, Zachary Lee Johnson, Michael R Wasserman, Jesper Levring, Jue Chen, et Shixin Liu. 2020. « Characterization of the kinetic cycle of an ABC transporter by single-molecule and cryo-EM analyses » éd. László Csanády, Olga Boudker, László Csanády, Markus A Seeger, et Gergely Szakacs. *eLife* 9: e56451. doi:10.7554/eLife.56451.
- Wanke, D., et H. Uner Kolukisaoglu. 2010. « An Update on the ABCC Transporter Family in Plants: Many Genes, Many Proteins, but How Many Functions? » *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 12 Suppl 1: 15-25. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00380.x.
- 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* 110(33): 13386-91. doi:10.1073/pnas.1309275110.
- Wei, Hui, Venkata P. Dandey, Zhening Zhang, Ashleigh Raczkowski, Willam J. Rice, Bridget Carragher, et Clinton S. Potter. 2018. « Optimizing “self-wicking” nanowire grids ». *Journal of Structural Biology* 202(2): 170-74. doi:10.1016/j.jsb.2018.01.001.
- Weinert, Tobias, Petr Skopintsev, Daniel James, Florian Dworkowski, Ezequiel Panepucci, Demet Kekilli, Antonia Furrer, et al. 2019. « Proton Uptake Mechanism in Bacteriorhodopsin Captured by Serial Synchrotron Crystallography ». *Science (New York, N.Y.)* 365(6448): 61-65. doi:10.1126/science.aaw8634.
- Weissenberger, Giulia, Rene J. M. Henderikx, et Peter J. Peters. 2021. « Understanding the Invisible Hands of Sample Preparation for Cryo-EM ». *Nature Methods* 18(5): 463-71. doi:10.1038/s41592-021-01130-6.
- White, H. D., K. Thirumurugan, M. L. Walker, et J. Trinick. 2003. « A second generation apparatus for time-resolved electron cryo-microscopy using stepper motors and electrospray ». *Journal of Structural Biology* 144(1): 246-52. doi:10.1016/j.jsb.2003.09.027.
- White, H. D, M. L Walker, et J Trinick. 1998. « A Computer-Controlled Spraying-Freezing Apparatus for Millisecond Time-Resolution Electron Cryomicroscopy ». *Journal of Structural Biology* 121(3): 306-13. doi:10.1006/jsbi.1998.3968.
- « WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance ». <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240093461> (31 mai 2024).
- Wiseman, Benjamin, Arnaud Kilburg, Vincent Chaptal, Gina Catalina Reyes-Mejia, Jonathan Sarwan, Pierre Falson, et Jean-Michel Jault. 2014. « Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA ». *PLoS ONE* 9(12): e114864. doi:10.1371/journal.pone.0114864.
- Woubshete, Menebere, Sara Cioccolo, et Bernadette Byrne. 2024. « Advances in Membrane Mimetic Systems for Manipulation and Analysis of Membrane Proteins: Detergents, Polymers, Lipids and Scaffolds ». *ChemPlusChem* 89(6): e202300678. doi:10.1002/cplu.202300678.

- Yeh, Vivien, Alice Goode, et Boyan B. Bonev. 2020. « Membrane Protein Structure Determination and Characterisation by Solution and Solid-State NMR ». *Biology* 9(11): 396. doi:10.3390/biology9110396.
- 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. doi:10.1016/s0014-5793(00)01677-x.
- Yerushalmi, Hagit, Mario Lebendiker, et Shimon Schuldiner. 1995. « EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa Multidrug Transporter, Exchanges Toxic Cations and H⁺ and Is Soluble in Organic Solvents (*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270(12): 6856-63. doi:10.1074/jbc.270.12.6856.
- Yildiz, Ahmet, Michio Tomishige, Arne Gennerich, et Ronald D. Vale. 2008. « Intramolecular Strain Coordinates Kinesin Stepping Behavior along Microtubules ». *Cell* 134(6): 1030-41. doi:10.1016/j.cell.2008.07.018.
- Yoder, Nate, Farzad Jalali-Yazdi, Sigrid Noreng, Alexandra Houser, Isabelle Bacongus, et Eric Gouaux. 2020. « Light-coupled cryo-plunger for time-resolved cryo-EM ». *Journal of structural biology* 212(3): 107624. doi:10.1016/j.jsb.2020.107624.
- Yoniles, Joseph, Jacob A. Summers, Kara A. Zielinski, Cali Antolini, Mayura Panjalingam, Stella Lisova, Frank R. Moss, et al. 2024. « Time-resolved cryogenic electron tomography for the study of transient cellular processes ». *Molecular Biology of the Cell* 35(7): mr4. doi:10.1091/mbc.E24-01-0042.
- Yu, Jie, Jingpeng Ge, Johanna Heuveling, Erwin Schneider, et Maojun Yang. 2015. « Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(16): 5243-48. doi:10.1073/pnas.1415037112.
- Zampaloni, Claudia, Patrizio Mattei, Konrad Bleicher, Lotte Winther, Claudia Thäte, Christian Bucher, Jean-Michel Adam, et al. 2024. « A Novel Antibiotic Class Targeting the Lipopolysaccharide Transporter ». *Nature* 625(7995): 566-71. doi:10.1038/s41586-023-06873-0.
- Zhong, Ellen D., Tristan Bepler, Bonnie Berger, et Joseph H. Davis. 2021. « CryoDRGN: Reconstruction of Heterogeneous Cryo-EM Structures Using Neural Networks ». *Nature Methods* 18(2): 176-85. doi:10.1038/s41592-020-01049-4.
- Zhou, Yan, Pedro Ojeda-May, et Jingzhi Pu. 2013. « H-Loop Histidine Catalyzes ATP Hydrolysis in the E. Coli ABC-Transporter HlyB ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 15(38): 15811-15. doi:10.1039/C3CP50965F.
- Zoghbi, Maria E., et Guillermo A. Altenberg. 2014. « ATP Binding to Two Sites Is Necessary for Dimerization of Nucleotide-Binding Domains of ABC Proteins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443(1): 97-102. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.050.