

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **08 novembre 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur Loïck MOISSONNIER**

Titre de la thèse : 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.

Résumé



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'étude sur ces transporteurs 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 intimement lié par 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 en présence de ligands (Rhodamine 6G, Hœchst 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 poly-spécificité. 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 repose sur 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 a consisté à reconstituer BmrA dans un environnement amphipathique plus natif que les détergents 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.

Mots-clés : CryoEM en temps résolu, Enzymologie structurale, Liposome, Protéine membranaire, Dynamique