

# Laboratoire d'Imagerie Biomédicale



Sorbonne Université  
UMR CNRS 7371 - INSERM 1146  
Centre de Recherche des Cordeliers  
15, rue de l'école de médecine  
75006 cedex Paris



Le 25 septembre 2019

**Proposition de stage Master M2** (date de début et de fin) : Janvier à juin 2020

**Co-responsables de stage** : Houssain Benabdelhak (MCU-SU) et Bruno Dassy (MCU-SU)

**Titre du projet de stage** : modulation du transport membranaire par les ultrasons de faible puissance. Application au système de pompe à efflux AcrA-AcrB-TolC impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*.

L'irradiation par ultrasons (US) de faible puissance des milieux biologiques induit de nombreux effets thérapeutiques comme rapportés dans la littérature depuis plusieurs années : augmentation de la croissance cellulaire, réparation accélérée des fractures osseuses, détachement des biofilms bactériens, réduction de la résistance aux antibiotiques ou encore thérapie anti-cancéreuse [1, 2]. Si l'action des US de forte puissance est généralement liée à une augmentation locale de température et/ou rupture réversible de la membrane cellulaire, le mécanisme d'action des US de faible puissance (entre 0 et 5 MPa) reste mal compris [3]. Les travaux récents portant sur la modulation de l'activité neuronale par les US de faible puissance suggèrent l'implication de transporteurs membranaires mais cela reste à confirmer [4, 5, 6].

Nos efforts actuels sont axés sur la validation de ce nouveau concept thérapeutique et la compréhension de son mécanisme moléculaire. Le modèle expérimental choisi est basé sur l'étude de la modulation par US de l'activité du système de pompe à efflux AcrA-AcrB-TolC impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *E. coli*. Ce système tripartite forme un complexe qui traverse la double membrane bactérienne avec comme transporteur principal AcrB, localisé dans la membrane cytoplasmique et utilisant la force protomotrice pour rejeter l'antibiotique dans le milieu externe [7].

Nous avons reconstitué un système d'efflux simplifié *in vitro* pour étudier sa modulation par les US à une fréquence de 1 MHz et à différentes puissances (pressions acoustiques de 1 à 5 MPa). En effet, AcrB possède une activité basale de transport indépendamment des 2 autres composants du complexe. Cette protéine purifiée est insérée dans la membrane des liposomes et la modulation de son activité est suivie grâce au transport de son substrat chromogène, la nitrocéfine. Celle-ci est dosée après hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase encapsulée à l'intérieur des liposomes. La force protomotrice est générée par une différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur du liposome. Les résultats préliminaires montrent une stimulation significative du transport par AcrB observée à une puissance thérapeutique non destructive de 1 MPa aussi bien à 27 qu'à 37°C. Cette stimulation ne serait pas due à un effet thermique. Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes pour d'éventuelles applications thérapeutiques.

Dr. Houssain Benabdelhak, Enseignant-Chercheur à Sorbonne Université, Spécialité Microbiologie

Téléphone : (33) 6 62 70 10 23 - Télécopie : (33) 1 46 33 56 73

E-mail : [houssain.benabdelhak@sorbonne-universite.fr](mailto:houssain.benabdelhak@sorbonne-universite.fr); [bruno.dassy@sorbonne-universite.fr](mailto:bruno.dassy@sorbonne-universite.fr)

Web : <https://www.lib.upmc.fr/>

Pour ce stage, nous proposons de simplifier encore plus l'approche en utilisant un autre substrat d'AcrB dont les propriétés fluorescentes permettront de quantifier son transport sans la  $\beta$ -lactamase. Le rouge Nile sera encapsulé dans les liposomes et son expulsion par AcrB sera suivie par spectrofluorométrie [8]. La confirmation des résultats nécessitera l'obtention d'une protéine mutante d'AcrB déficiente dans l'utilisation de la force protomotrice. Le projet prévoit de consolider ces résultats *in vivo* en étudiant la modulation par les US de la résistance à la céfoxitine (antibiotique analogue de la nitrocéfine), elle aussi substrat d'AcrB. La quantification se fera par le dénombrement des cellules viables. L'étudiant(e) appliquera des techniques de microbiologie, biologie moléculaire, biochimie des protéines membranaires/lipides et biophysique. Le sujet est susceptible de se poursuivre par une thèse après concours auprès de l'école doctorale dont relève notre laboratoire «ED393 - Santé Publique : épidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale». La thèse se déroulera sous la co-responsabilité de Nicolas Taulier (CR1-CNRS, HDR et responsable d'équipe) et Houssain Benabdelhak (MCU-SU).

### **Références bibliographiques :**

- [1] Yu H, Chen S, Cao P, 2012. *Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria: a review*. Ultrason Sonochem, 19(3): 377-82.
- [2] Tang J, Guha C, Tomé WA, 2015. Biological Effects Induced by Non-thermal Ultrasound and Implications for Cancer Therapy: A Review of the Current Literature. Technol Cancer Res Treat. 14(2):221-35.
- [3] Krasovitski B., Frenkel V., Shoham S., Kimmel E., 2011. *Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects*. PNAS, 108(8): 3258-3263.
- [4] Leinenga G, Langton C, Nisbet R, Götz J, 2016. *Ultrasound treatment of neurological diseases-current and emerging applications*. Nat Rev Neurol, 12: 161–174.
- [5] Tyler WJ, Lani SW, Hwang GM, 2018. *Ultrasonic modulation of neural circuit activity*. Curr Opin Neurobiol, 50: 222-231.
- [6] Babakhanian M, Yang L, Nowroozi B, Saddik G, Boodaghians L, Blount P, Grundfest W, 2018. *Effects of Low Intensity Focused Ultrasound on Liposomes Containing Channel proteins*. Sci Rep., 8(1):17250.
- [7] Li XZ, Plésiat P. , Nikaido H., 2015. *The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria*. Clin Microbiol Rev, 28(2): 337–418.
- [8] Jürgen A. Bohnert, Brian Karamian, Hiroshi Nikaido, 2010. *Optimized Nile Red Efflux Assay of AcrAB-TolC Multidrug Efflux System Shows Competition between Substrates*. Antimicrob Agents Chemother., 54(9): 3770–3775.