

Laboratoire d'Imagerie Biomédicale



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 08 octobre 2020

Proposition de stage Master M2 (date de début et de fin) : Janvier à juin 2021

Responsables de stage : Houssain Benabdelhak Enseignant-Chercheur à Sorbonne Université)

Titre du projet de stage : effet des ultrasons focalisés de faible puissance (UFFP) sur la modulation du transport membranaire. Application au système de pompe à efflux AcrA-AcrB-TolC impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DU STAGE

L'application des UFFP sur des milieux biologiques induit de nombreux effets thérapeutiques selon le type cellulaire et la structure des tissus : augmentation de la croissance cellulaire, réparation accélérée des fractures osseuses, réduction de la résistance aux antibiotiques ou encore thérapie anti-cancéreuse (1-3). Plusieurs travaux ont attribué aux UFFP la capacité de moduler de manière réversible l'activité cérébrale *in vivo* pour traiter des dysfonctionnements neurologiques comme l'épilepsie et les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (4-6). Les mécanismes responsables des effets induits par les UFFP sont inconnus. Le sujet reposera sur une pompe d'efflux qui représente un des mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques (ATB). Le modèle choisi est le système AcrA-AcrB-TolC, de la bactérie *E. coli*. Au labo, le transporteur AcrB « moteur » a été purifié puis inséré dans des liposomes. Son fonctionnement a été suivi grâce au transport actif d'un de ses substrats antibiotique. Nous avons soumis ce système à des UFFP. Nos résultats montrent une modulation importante du transport de l'ATB par AcrB. Il s'agit pour ce stage d'en comprendre le mécanisme. Objectif 1: construire deux mutants de AcrB puis de purifier ces protéines mutées qui seront ensuite insérées dans des liposomes. Les protéoliposomes reconstitués *in vitro* permettront de faire les expériences de transport de l'ATB avec ou sans UFFP. Le mutant d'AcrB déficient dans la force promotrice servira de contrôle négatif pour démontrer qu'il n'y a pas de formation de pores suite à l'exposition aux UFFP (8). Objectif 2: mettre en place un protocole qui permettra de suivre la fixation d'un de ces substrats fluorescent (F5M), par la mesure des variations de fluorescence. Pour cela nous construirons le mutant AcrBPhe615Cyst et la quantité de F5M fixée de manière irréversible sera estimée. Cette fixation sera confirmée par des expériences de compétition avec d'autres ATB (9). La comparaison de ces différentes combinaisons devrait permettre la mise en évidence d'une modification de la fixation des substrats sous UFFP, donc d'un changement de conformation d'AcrB. Ce serait la première démonstration expérimentale d'un tel mécanisme d'action des UFFP sur une protéine. Objectif 3 si le temps le permet, nous mettrons en évidence la modulation par UFFP de la pompe complète *in vivo* en utilisant un protocole déjà optimisé au LiB (10).

L'étudiant(e) appliquera des techniques de microbiologie, biologie moléculaire, biochimie des protéines membranaires/lipides et de biomécanique par les ultrasons. Le sujet est susceptible de se poursuivre par une thèse après concours auprès de l'école doctorale dont relève notre laboratoire « ED393 ». La thèse sera co-dirigée par Nicolas Taulier (physicien DR2-CNRS et HDR) et ma personne (microbiologiste/biochimiste). Le projet de thèse portera également sur la modulation par UFFP du transporteur des ions chlorures, la protéine CFTR dont le dysfonctionnement est responsable de la mucoviscidose.

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

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

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] Doyeon K., Suhyun P., Hongkeun Y., Suhyeon P., Jeewon K., Kyuhee Y.,Kwangmeyung K. and Hyuncheol K., 2020. Overcoming anticancer resistance by photodynamic therapy-related efflux pump deactivation and ultrasound-mediated improved drug delivery efficiency. *Nano Convergence*, 7:30.
- [3] 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.
- [4] Leinenga G. and Götz J., 2015. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Science Translational Medicine*7, Issue 278, pp. 278ra33.
- [5] Leinenga G, Langton C, Nisbet R, Götz J, 2016. *Ultrasound treatment of neurological diseases--current and emerging applications. Nat Rev Neurol*, 12: 161–174.
- [6] Tyler WJ, Lani SW, Hwang GM, 2018. *Ultrasonic modulation of neural circuit activity. Curr Opin Neurobiol*, 50: 222-231.
- [7] Zwama, M., Yamasaki, S., Nakashima, R., Sakurai, K., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2018). Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition. *Nature Communications* 9(1):124.
- [8] 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.
- [9] Takatsuka Y, Chen C, Nikaido H., 2010. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of Escherichia coli. *PNAS* 107(15):6559-65.
- [10] Nagano K, Nikaido H., 2009. Kinetic behavior of the major multidrug efflux pump AcrB of Escherichia coli. *PNAS* 106(14):5854-8.