

Approche Biomimétique pour l'étude de l'assemblage d'une pompe d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* impliquée dans la résistance antibiotique

Ce projet se situe dans le contexte de la lutte contre la résistance aux antibiotiques, problème de santé majeur de notre siècle. Les bactéries ont développé plusieurs stratégies pour lutter contre notre arsenal thérapeutique, dont l'efflux actif impliquant des pompes à efflux tripartites [Li & Nikaido, *Drugs* 2009]. *Pseudomonas aeruginosa* (PA), bactérie opportuniste, fait partie des pathogènes classés par l'OMS comme cible d'étude prioritaire [Tacconelli & al., *The Lancet* 2017]. PA présente douze systèmes d'efflux dans son génôme dont quatre codant pour des pompes impliquées dans la résistance à la plupart des familles d'antibiotiques existant à l'heure actuelle, expulsant les antibiotiques à l'extérieure de la cellule avant même qu'ils n'atteignent leur cible. Ces pompes sont constitués de trois protéines, MFP-RND-OMF, localisées respectivement dans le périplasme, la membrane interne, et la membrane externe.

Notre équipe a récemment résolu par cryo-microscopie électronique la structure de la pompe MexA-MexB-OprM [Glavier & al., *Nat Com* 2020], pompe de PA exprimée de façon constitutive. Cette structure nous a permis de proposer un mécanisme fonctionnel de l'efflux.

Néanmoins, il manque à cet édifice reconstitué *in vitro*, un des acteurs membranaires, le peptidoglycan (PG). Celui-ci a été visualisé à l'extrémité de la protéine périplasmique sur des images obtenues par tomographie sur des bactéries *E. coli* [Shi & al., *Nat Com* 2019]. Nous avons montré récemment par une approche de pull-down que le PG était un stabilisateur de l'interaction entre MexA et OprM [Ma & al. *Int J Mol Sci.* 2021]. Nous voulons maintenant caractériser cette interaction en exploitant des outils de fonctionnalisation et de caractérisation de surfaces. Nous fabriquerons donc des systèmes modèles mimant l'auto-assemblage de la pompe MexA-MexB-OprM dans son environnement lipidique en contrôlant l'orientation et la stoechiométrie des composants purifiés (OprM, PG et MexA) sur des bicouches lipidiques supportés sur des surfaces solides. Pour l'analyse des interactions de ce complexe pris en sandwich à l'interface OprM-PG-MexA, nous utiliserons des méthodes physico-chimiques de caractérisation de surface telle que la microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation (QCM-D) et des méthodes d'imagerie telle que la microscopie à force atomique (AFM) pour évaluer l'organisation morphologique des différents complexes étudiés à l'échelle moléculaire.

Le protocole de purification des protéines MexA et OprM ainsi que du peptidoglycan de PA ont dorénavant et déjà été optimisés au laboratoire. L'étudiant(e) devra produire et purifier ces différentes molécules. Il/elle bénéficiera de l'expertise de l'équipe Signalisation et transport membranaire (laboratoire CiTCoM, UParis) pour la partie biochimie. L'étudiant(e) aura également accès aux infrastructures et aux techniques de caractérisations physico-chimiques au Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS, Sorbonne Université) et le laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie (BMBI, UTC).

Mots clés : Protéines membranaires, biochimie, biophysique, fonctionnalisation de surface, QCM-D, AFM.

Contact : Si vous êtes intéressé.e, merci de contacter Isabelle Broutin (isabelle.broutin@parisdescartes.fr), Nesrine Aissaoui (nesrine.aissaoui@parisdescartes.fr), et Jessem Landoulsi (jessem.landoulsi@sorbonne-universite.fr) en joignant CV et lettre de motivation.