

Etude fonctionnelle et quantitative de la pompe d'efflux MexA-MexB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*

Dhenesh Puvanendran, Quentin Cece & Martin Picard

Laboratoire de Biologie Physico-Chimique des Protéines Membranaires, CNRS UMR 7099, Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC), Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, PSL Research University, Paris, France.

Les pompes d'efflux sont des systèmes impliqués dans le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Elles sont classifiées en fonction de l'énergie qu'elles utilisent pour effectuer le transport d'antibiotiques (Hydrolyse de l'ATP ou contre transport d'ions). Chez les bactéries à Gram-négatif, les pompes d'efflux de type RND (Resistance, Nodulation, and Cell Division) utilisent un gradient de protons pour transporter les antibiotiques et sont composées des trois protéines suivantes : une protéine périplasme (appartenant à la famille des MFP) et un transporteur (famille des RND) ancrés dans la membrane interne de la bactérie, et une protéine localisé dans la membrane externe (famille des OMF). Au laboratoire, nous nous intéressons à la pompe d'efflux MexA-MexB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le but de mon projet est de mesurer *in vitro* des vitesses de transport par la pompe d'efflux MexA-MexB-OprM. Pour cela, les protéines MexA et MexB sont reconstitués dans un premier liposome, et OprM dans un second liposome. Les mesures de transport se font suite à l'assemblage de la pompe d'efflux en protéoliposomes. La preuve de concept de ce procédé a déjà été décrite, et a mené à une étude qualitative des mesures de transport. L'objectif de ma thèse a été d'améliorer le protocole de reconstitution en liposomes et de valider la qualité de nos échantillons afin de rendre le système quantitative lors des mesures de transport. Pour cela, nous avons aussi pris soin de déterminer l'efficacité de reconstitution des protéines en liposomes.

Après une brève introduction sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques, je m'attarderai sur certains aspects structuraux et fonctionnels des pompes d'efflux de type RND. Je présenterai par la suite ma méthode de reconstitution des protéines MexA, MexB et OprM en liposome. Je montrerai dans une troisième partie différentes manières de vérifier la qualité de nos protéoliposomes, avant d'aborder mes mesures de vitesse de transport par Stopped-flow. Enfin, je présenterai des données structurales en lien avec mes tests fonctionnels permettant de mieux comprendre le mécanisme de transport d'antibiotiques.

References

Rigaud J-L, Lévy D (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Meth Enzymol* 372:65–86.

Verchère A, Dezi M, Adrien V, Broutin I, Picard M (2015) In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications* 6(1). doi:10.1038/ncomms7890.

Puvanendran D, Cece Q, Picard M (2017) Reconstitution of the activity of RND efflux pumps: a "bottom-up" approach. *Research in Microbiology*. doi:10.1016/j.resmic.2017.11.004.

Institut de Biologie Physico-Chimique
Laboratoire de Biologie Physico-chimique des protéines membranaires
13, rue Pierre et Marie Curie
75005 PARIS
Mail : dhenesh.puvanendran@ibpc.fr

Functionnal and quantitative studies of MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*

Dhenesh Puvanendran, Quentin Cece & Martin Picard

Laboratoire de Biologie Physico-Chimique des Protéines Membranaires, CNRS UMR 7099, Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC), Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, PSL Research University, Paris, France.

Efflux pumps are the major systems in bacterial resistance against antibiotics. They are classified by the energy needed to be active (ATP hydrolysis or ion counter-transport). Efflux pumps from the RND (Resistance, Nodulation, and cell Division) family use a proton gradient to be active and are composed of three proteins: a membrane fusion protein (MFP) and a transporter (RND) in the inner membrane, and an Outer Membrane Factor (OMF) localized in the outer membrane. We focus on the MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*.

The overall goal of my research is to measure the velocity of transport by efflux pumps *in vitro*. To that end, we reconstitute MexA and MexB as one population of proteoliposome, and OprM as another population of proteoliposome. The whole tripartite pump forms upon association of the respective populations of liposomes. The proof of concept of this method has already been described, leading to a qualitative monitoring of transport. Our project was to define a reconstitution procedure amenable to now quantify the rate of transport. To do so we had to take extreme care to precisely determine the efficiency of protein reconstitution and the quality of our proteoliposomes.

After a short introduction on the mechanism of resistance to antibiotics, and generalities on efflux pump, I will present the roadmap towards the rational, step-by-step, reconstitution of the MexA-MexB-OprM efflux pump as well as the methodologies that have been undertaken to check the quality of our proteoliposomes and to measure the velocity of transport using a Stopped-flow apparatus. I will finally present some structural studies which led us to interpret the mechanism of antibiotics export.

References

Rigaud J-L, Lévy D (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Meth Enzymol* 372:65–86.

Verchère A, Dezi M, Adrien V, Broutin I, Picard M (2015) In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications* 6(1). doi:10.1038/ncomms7890.

Puvanendran D, Cece Q, Picard M (2017) Reconstitution of the activity of RND efflux pumps: a “bottom-up” approach. *Research in Microbiology*. doi:10.1016/j.resmic.2017.11.004.

Institut de Biologie Physico-Chimique
Laboratoire de Biologie Physico-chimique des protéines membranaires
13, rue Pierre et Marie Curie
75005 PARIS
Mail : dhenesh.puvanendran@ibpc.fr