

**PROPOSITION SUJET de MASTER 2017-2018**

**TITRE** : Incidence de la voie de détoxification TPMT (thiopurine S-méthyle transférase) dans la répartition environnementale des *Pseudomonas aeruginosa*

**Nom, Prénom du Maitre de Stage : Cournoyer - Benoit**

**Qualité : DR CNRS**

**Téléphone : 04 78 87 25 99**

**E-mail : [benoit.cournoyer@vetagro-sup.fr](mailto:benoit.cournoyer@vetagro-sup.fr)**

**Nom, Prénom du co-encadrant éventuel :**

**Qualité :**

**Téléphone :**

**E-mail :**

**Laboratoire d'accueil, Responsable et équipe : UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne (Y. Moëgne-Loccoz), Equipe BPOE « Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement (resp. B. Cournoyer) ».**

**Adresse :**

**VetAgro Sup, aile 3 niveau 1, 1 avenue Bourgelat 69280 Marcy L'Etoile**

**Nom du candidat éventuellement proposé :**

S'il n'est pas retenu, acceptez-vous un autre candidat ?

Oui - Non

### Contexte du sujet :

La TPMT, une thiopurine méthyle transférase dépendante de la S-adenosyl methionine (SAM), permet la transformation et détoxication de plusieurs médicaments comme les thiopurines, et plusieurs antimicrobiens dont le tellurite et sélénite. Cette enzyme est essentielle chez l'homme pour la gestion de la toxicité de l'azathioprine (Imurel®) et de la 6-mercaptopurine (Purinéthol®) permettant de lutter contre le cancer et certaines maladies inflammatoires chroniques intestinales (e. g. Nature Reviews Cancer 8, 24-36). Notre équipe est à l'origine de la description de cette enzyme chez les bactéries (bTPMT). Ces travaux ont permis de démontrer le rôle de la bTPMT dans la détoxication et volatilisation de plusieurs métalloïdes dont le Te, S et Se (e. g. J Bacteriol. 2002 184(11):3146-9 ; Environ Microbiol. 2012 14(10):2645-60). Le spectre des substrats de la bTPMT reste toutefois à approfondir. Les études de répartition du gène codant la bTPMT, nommé *tpm*, montre une conservation restreinte à certains genres bactériens, et une occurrence élevée chez des espèces pathogènes opportunistes comme les *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*, et *Vibrio cholerae*. Des analyses récentes de la diversité d'amplicons PCR *tpm* de plusieurs habitats (réalisées par l'équipe) ont également permis d'observer sa présence au sein de bactéries thioautotrophes produisant leur énergie via une oxydation du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). Une exposition au H<sub>2</sub>S peut être toxique en raison d'une inhibition de la cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire.

### Hypothèses :

Les hypothèses de ce projet de M2r sont donc que la bTPMT permettrait une détoxication (1) du H<sub>2</sub>S en favorisant sa méthylation sous la forme de méthyle sulfide (DMS) ou diméthyle sulfide (DMDS), et (2) d'antimicrobiens comme des antagonistes de la synthèse de l'ADN (Purinéthol). Ces activités de méthylation expliqueraient certains biais dans la répartition des bactéries productrices de bTPMT.

### Objectifs :

Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux seront :

- a) préciser les substrats de la bTPMT
- b) étudier les conditions d'expression du gène *tpm* chez *P. aeruginosa*
- b) évaluer les avantages conférés par la bTPMT chez *P. aeruginosa*

### Démarche expérimentale

**1. Expression de *tpm*. (a) culture pure.** Les études d'expression du gène *tpm* nécessiteront le développement d'approches de RT qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR) sensibles et spécifiques de l'espèce *P. aeruginosa*. Les niveaux d'expression de *tpm* seront analysés en faisant varier les formes et concentrations de métalloïdes (Te, Se, et S). Les travaux débiteront par l'analyse des effets d'une exposition au tellurite, un oxyanion très toxique pour les bactéries mais rapidement volatilisé par les bTPMT, et les effets d'un médicament, le Purinéthol et ses analogues. Les conditions d'expression de la bTPMT seront par la suite comparées à celles obtenues en présence d'H<sub>2</sub>S. Les expérimentations en présence d'H<sub>2</sub>S seront réalisées en collaboration avec l'ISA. Les produits de la méthylation feront l'objet d'analyses par GC-MS (plateforme CESN et / ou ISA). **(b) milieux complexes.** L'expression des *tpm* de *P. aeruginosa* en milieux naturels exposés au H<sub>2</sub>S (réseau unitaire de Grézieu – la – Varenne / station expérimentale OTHU-ZABR ; digestats de méthaniseur, composts) sera analysée par RT qPCR. Les concentrations d'H<sub>2</sub>S des prélèvements seront mesurées durant les expérimentations (via le collaborateur CESN et / ou ISA). Cette expression en présence d'H<sub>2</sub>S sera comparée à celle déduite de l'analyse de la totalité des cDNA *tpm* amplifiables par les amorces conservées au sein des gamma-protéobactéries. Si le temps le permet, les amplicons *tpm* des gamma-protéobactéries seront séquencés et analysés pour évaluer les niveaux relatifs d'expression de ce déterminant en fonction de l'espèce.

**2. Inactivation du gène *tpm* et incidence sur les niveaux de résistance aux antimicrobiens.** **(a)** le gène *tpm* sera inactivé par mutagenèse insertionnelle chez *P. aeruginosa*. Les conséquences de cette inactivation sur les niveaux de résistance aux oxyanions et activités de méthylation du H<sub>2</sub>S et Te seront évaluées par tests de croissance et /ou d'activités. **(b)** Les phénotypes du mutant en termes de changements de capacités d'utilisation ou de résistance à d'autres antimicrobiens et médicaments seront analysés par la méthode omnilog combo – phenotypic microarray (PARMIC).

### Perspectives et collaborations :

Les travaux seront réalisés dans le cadre du projet ANR Digestate qui a, entre autres, comme objectif d'évaluer l'incidence de la méthanisation sur les changements de communautés bactériennes et transformation de contaminants chimiques. Ce M2R sera effectué en collaboration avec un post-doctorant et autres membres de l'équipe. Il pourra se poursuivre en thèse sur le même thème ; des profilages transcriptomiques et analyse des processus de régulation compléteront alors le sujet.

