Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Rôle d'un ABC transporteur dans la résistance au Cu chez Cau/obacter crescentus

Hoche, Alice

Award date:
2017

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 20. Apr. 2024

UNIVERSITÉ DE NAMUR

Faculté des Sciences

RÔLE D'UN ABC TRANSPORTEUR DANS LA RÉSISTANCE AU CUIVRE CHEZ *CAULOBACTER CRESCENTUS*

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Alice HOCHE

Janvier 2017

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Rôle d'un ABC transporteur dans la résistance au Cu chez *Caulobacter crescentus*

HOCHE Alice

Résumé

Afin de survivre, les bactéries doivent être capables de s'adapter rapidement à des variations de leur environnement, qui peuvent constituer des stress. Un des stress que ces organismes peuvent rencontrer au cours de leur vie est la présence de métaux lourds dans l'environnement, notamment le cuivre (Cu). Bien que ce métal soit essentiel pour de nombreux processus biologiques à faible concentration, il peut s'avérer cytotoxique à plus forte concentration. Cette dualité du Cu nécessite une régulation très fine de son homéostasie. *Caulobacter crescentus* est une alpha-protéobactérie, pionnière dans des environnements pollués en Cu, c'est pourquoi on s'y intéresse au laboratoire.

Les bactéries ont développé divers mécanismes afin de faire face à un stress en Cu. Trois systèmes principaux de résistance au Cu ont été décrits chez la bactérie *Escherichia coli* et sont conservés chez *C. crescentus* : le système Cue, le système Cus et le système Pco. Cependant il existe d'autres systèmes de résistance aux métaux lourds tels que les ATP-binding cassette (ABC) transporteurs. Au cours d'un crible nous avons identifié des candidats potentiellement impliqués dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*. Dans cette étude, le rôle d'un de ces candidats (une ABC transporteur perméase) a été étudié.

L'ABC transporteur perméase est impliquée dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*. Le système PcoA/B de *C. crescentus* a été caractérisé précédemment dans le laboratoire, mais des inconnues demeurent, notamment la manière dont il est alimenté en Cu. Notre première hypothèse était que l'ABC transporteur perméase coopère avec le système PcoA/B pour résister à un stress en Cu. Cependant, nos premiers résultats ne soutiennent pas cette hypothèse. Nous avons dès lors envisagé d'autres hypothèses : l'ABC transporteur perméase fonctionnerait avec un ou plusieurs autres systèmes pour expulser le Cu hors de la cellule. Elle pourrait également transporter un autre composé que le Cu, par exemple un chélateur.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2017

Promoteur: J.-Y. Matroule

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon promoteur, Monsieur Jean-Yves Matroule de m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ce mémoire. Merci pour ses conseils et pour le temps qu'il m'a consacré pendant cette période.

Un merci particulier à Seb, mon encadrant durant ce mémoire, pour ses conseils, sa disponibilité mais aussi sa patience. Merci aussi pour son enthousiasme et pour m'avoir boostée (plus d'une fois) quand j'avais des coups de mous.

Merci également au reste de la BEAR team pour leur aide et leurs conseils. Merci à Eme pour sa bonne humeur permanente et ses nombreux coups de mains, surtout durant les trois semaines où Seb n'était pas là. Merci à Françoise pour ses conseils et sa gentillesse. Merci aussi à Gwen pour m'avoir soutenue sur la fin ! Et merci de poursuivre les expériences sur ce fameux mutant qu'on a tant attendu !

Merci à tout le reste de l'URBM pour tous les petits conseils donnés par ci par là et pour la bonne ambiance du labo. Merci à Jérôme et Séverin pour leur bonne humeur et pour avoir toujours été là pour m'aider quand j'étais un peu paumée... Merci à Kévin et Christian pour leurs conseils (et leur patience) sur le FACS. Merci aussi à Pierre Cambier, qui m'a fait découvrir l'AAS. Je remercie également tous les mémos : Carole, Maxime, Pierre, Agnès et Margaux. Merci à tous !

Je remercie d'avance Régis Hallez, Arnaud Machelart, Jean-François Sternon et Elise Dumortier pour le temps consacré à ce mémoire.

Pour finir, un Merci tout particulier à ma famille pour m'avoir toujours soutenue et supportée (même quand je râlais, c'est-à-dire très souvent…) depuis le début de mes études universitaires et durant ce mémoire.

Table des matières

Introduction **15**

1. Adaptation des bactéries face au stress 15
2. Le Cuivre 17
   1) Le cuivre en biologie 17
   2) Dualité du cuivre : un nutriment ou une cytotoxine 19
   3) Homéostasie du cuivre : un subtil équilibre 21
   4) Mécanismes principaux de détoxification du cuivre 23
   5) Autres systèmes de résistance aux métaux lourds 25
3. *Caulobacter crescentus* 37

Objectifs **41**

Résultats et Discussion **45**

1. Analyses *in silico* de l'ABC transporteur perméase CC_2244 45
2. Quel est le rôle de cette ABC transporteur perméase dans la résistance au Cu chez *C. crescentus* ? 47
   A. Tests sur le mutant transpositionnel 47
   B. Création d'un délétant propre pour *CC_2244* 47
   C. Complémentation de la souche délétante Δ*ABCt* 49
   D. Sensibilité du mutant Δ*ABCt* à d'autres métaux que le Cu 49
   E. Possibilité de coopération fonctionnelle entre le système PcoA/B et l'ABC transporteur perméase CC_2244 51
   F. Localisation de l'ABC transporteur perméase 53

Conclusions et Perspectives **59**

Matériels et Méthodes **65**

1. Souches et plasmides 65
2. Milieux 67
3. Constructions de souches 69
   a) Stratégie de construction des souches délétantes 69
   b) Stratégie de construction des souches complémentées 71
   c) Stratégie de construction de la souche taguée avec un tag *his* en N-terminal 71
4. Amorces utilisées pour la construction des souches 73

5. Détermination des courbes de croissance par Bioscreen 73
6. Immuno-blot 75
7. Comptage de cellules par cytométrie de flux (FACS) 75
Bibliographie **79**

Introduction

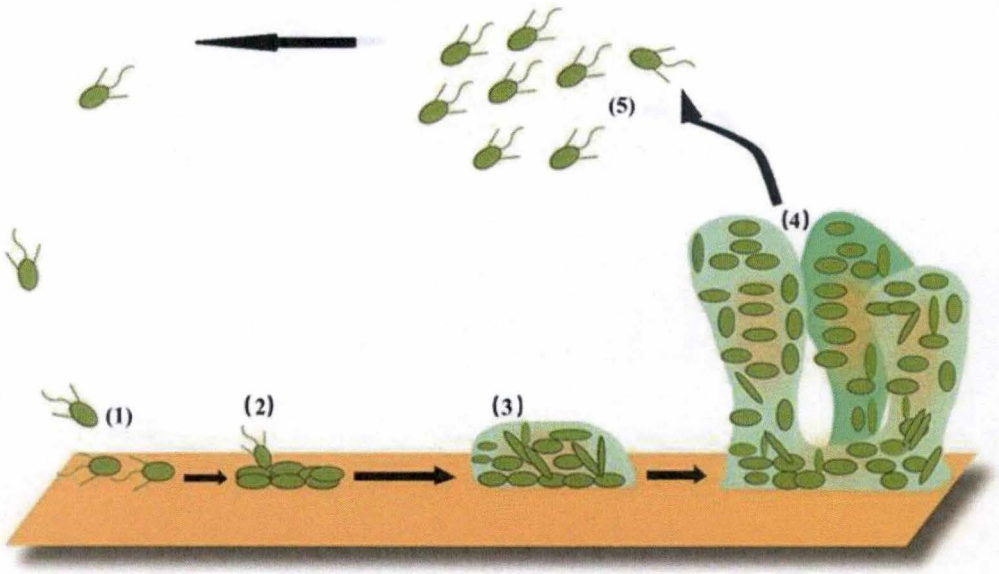


Figure 1 : Etapes de formation d'un biofilm (Mizan *et al.*, 2015)

Introduction

Tous les organismes vivants sont en contact étroit avec leur environnement, qui fluctue dans l'espace et au cours du temps. Dans un tel contexte, un organisme survit et se développe lorsqu'il se trouve dans un état d'équilibre dynamique, caractérisé par un cycle d'échange avec le milieu extérieur. Cet équilibre peut être régulièrement perturbé par des variations biotiques (concurrence) et abiotiques (physico-chimiques) de l'environnement, pouvant constituer un facteur de stress. La survie des organismes dépend alors de leur capacité à faire face et à s'adapter suffisamment rapidement à ces différentes perturbations, à ces stress.

1. Adaptation des bactéries face au stress

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotiques. Elles sont présentes dans tous les biotopes tels que les sols, les océans, ou encore les eaux douces. Elles peuvent aussi se retrouver dans des environnements hostiles et peu propices à la vie, comme les milieux pollués ou les milieux extrêmes tels que les glaciers ou les mines de cuivre. Afin de survivre dans de telles conditions, les bactéries doivent donc s'adapter rapidement aux variations de l'environnement.

Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux stress efficaces et diversifiés pour faire face à l'imprévisibilité de facteurs environnementaux, tels que la disponibilité en nutriments, la présence de produits toxiques (antibiotiques, métaux lourds), les variations de température, de pH ou encore des conditions osmotiques. Dans ce contexte, les réponses aux stress visent soit à restaurer l'homéostasie (expression de chaperonnes, synthèse de transporteurs) soit à se protéger contre les effets dus au stress (sporulation, formation de biofilms, motilité) (Kojetin *et al.*, 2005).

Certaines bactéries optent ainsi pour des modifications de leur morphologie afin de faire face à des stress. D'autres opèrent des changements physiologiques plus importants, changeant drastiquement leur programme d'expression génique. C'est le cas de *Bacillus*, *Clostridium* ou *Streptomyces*. Ces bactéries sont capables d'entrer en sporulation (Young, 2006). En effet, lorsque celles-ci font face à une carence nutritionnelle, elles engendrent un processus de sporulation pour générer une cellule dormante, métaboliquement inactive appelée spore (Leggett *et al.*, 2012). Cette spore est capable de supporter des conditions environnementales extrêmes pendant plusieurs années et devenir à nouveau active quand les conditions extérieures redeviennent favorables.

Un autre mécanisme de résistance supplémentaire mis en place par les bactéries est la formation de biofilms (Fig. 1). Certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent se rassembler et secréter une matrice extracellulaire polysaccharidique appelée biofilm.

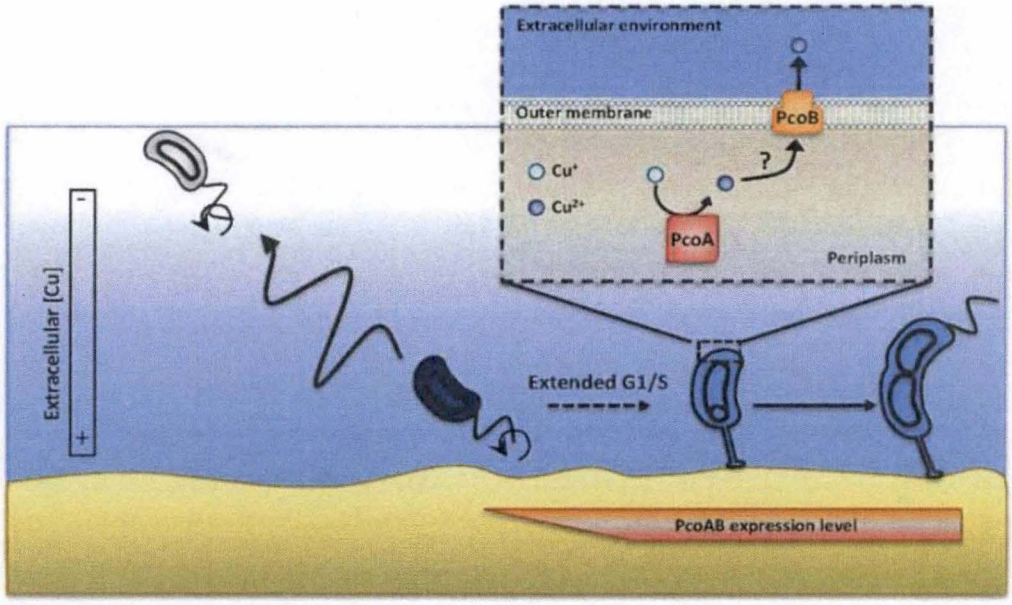


Figure 2 : Modèle de la réponse « Fight-or-Flight » de *C. crescentus* dans un environnement riche en Cu (Lawarée *et al.*, 2016)

Les biofilms constituent le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature et sont particulièrement problématiques dans les environnements industriels et médicaux. En effet, ils confèrent aux bactéries une meilleure résistance aux différentes agressions extérieures telles que les UV, les variations de pH et d'osmolarité ou encore les agents antimicrobiens. La matrice des biofilms agirait comme une barrière qui empêcherait la diffusion et la pénétration de certaines molécules toxiques. Sous forme de biofilm, les bactéries tolèrent ainsi les antibiotiques à des concentrations 10 à 1000 fois plus importantes qu'une bactérie isolée (Ceri *et al.*, 1999).

D'autre part, le chimiotactisme permet aux bactéries mobiles de se rapprocher des substances nutritives telles que les sucres, les acides aminés ou de fuir des substances nuisibles telles que les métaux lourds. C'est le cas par exemple de *Caulobacter crescentus*, qui génère 2 types de cellules filles (flagellée et pédonculée), lui permettant de mieux résister à des conditions stressantes. Emeline Lawarée a en effet montré que la cellule flagellée a tendance à fuir la source de Cu pour se réfugier dans un environnement moins stressant (Fig. 2) (Lawarée *et al.*, 2016). Un autre exemple est celui de *Campylobacter jejuni*, chez qui la présence d'un flagelle rend la bactérie mobile et capable de fuir une acidité extrême (Reid *et al.*, 2008).

Un des stress qui peut être rencontré par les bactéries au cours de leur vie est la présence de métaux lourds dans l'environnement, tels que le zinc (Zn), le plomb (Pb) ou encore le cuivre (Cu). Dans ce cas, des transporteurs et des chaperonnes sont *up-régulés* et permettent de maintenir le bon équilibre des ions métalliques. Durant mon mémoire je m'intéresse plus particulièrement au stress en Cu.

2. Le Cuivre

1) Le cuivre en biologie

À l'origine, l'atmosphère de la Terre était hautement réductrice et anaérobie. Le Cu se trouvait à l'état réduit Cu(I), sous forme de sulfures insolubles et n'était donc pas disponible pour les processus biologiques (Rensing & Grass, 2003). Lorsque les cyanobactéries photosynthétiques ont commencé à produire du dioxygène (O_2), l'atmosphère est progressivement devenue oxydante. Ce phénomène a permis l'oxydation du Cu^+ en Cu^{2+}, et sa solubilisation (Crichton & Pierre, 2001). La biodisponibilité grandissante du Cu a forcé les organismes à co-évoluer avec lui. Il y a alors eu une émergence de métalloprotéines et protéines régulatrices (Dupont *et al.*, 2011).

2) Dualité du cuivre : un nutriment ou une cytotoxine

Le Cu est un élément trace métallique essentiel pour tous les organismes aérobies. Sa capacité à alterner entre 2 états d'oxydation principaux, à savoir le Cu(I) (état cuivreux) et le Cu(II) (état cuivrique), en fait un excellent cofacteur pour des enzymes et métalloprotéines impliquées dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction. Le Cu participe ainsi à différents processus cellulaires importants tels que les phosphorylations oxydatives (cytochrome C oxydase), la protection contre le stress oxydatif (superoxyde dismutase) ou encore le transport du fer (Fe). Les enzymes bactériennes liant le Cu sont retrouvées majoritairement dans le périplasme ou enchâssées dans la membrane interne (Osman & Cavet, 2008) afin de maintenir une concentration cytoplasmique en Cu libre la plus faible possible, limitant ainsi la toxicité du métal.

En effet, les propriétés rédox du Cu peuvent également provoquer des dommages au sein de la cellule. Malgré son rôle critique dans un grand nombre de processus biologiques, le Cu peut s'avérer toxique lorsque sa concentration intracellulaire dépasse un certain seuil. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que l'excès de Cu^+ libre dans la cellule pourrait tout d'abord générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment le radical hydroxyle ($OH^\bullet$), en favorisant une réaction de type Fenton : $Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + OH^\bullet$ (Keyer & Imlay, 1996). Ces radicaux libres seraient responsables de graves dommages cellulaires altérant la fonction des macromolécules, incluant la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation des protéines et le clivage de molécules d'ARN et d'ADN (Macomber & Imlay, 2008). Le Cu^+ est considéré comme plus toxique pour la cellule que le Cu^{2+}, entre autres car il se situe préférentiellement dans le cytoplasme, un environnement réducteur (Rensing & Grass, 2003). Dans ce compartiment, le Cu^+ peut entrainer une toxicité en déstabilisant les clusters fer-soufre (Osman & Cavet, 2008).

Cependant, le Cu^{2+}, généralement présent dans le périplasme, peut lui aussi présenter une cytotoxicité. En raison de son potentiel rédox, il peut générer des radicaux $NO^\bullet$ via l'oxydation des S-Nitrosothiol. Ces radicaux sont moins réactifs que ceux générés par le Cu^+, mais restent potentiellement capables de créer des dommages oxydatifs. En outre, la série de Irving-Williams classe le Cu^{2+} comme l'un des ions métalliques les plus compétitifs. De ce fait, il peut déplacer d'autres cofacteurs métalliques de leur site de liaison dans des métalloprotéines, acides nucléiques et lipides, affectant ainsi leurs structure et fonction (Macomber & Imlay, 2009). Enfin, dans un environnement oxydant tel que le périplasme, le Cu^{2+} peut aussi entrainer la formation de ponts disulfures (Osman & Cavet, 2008).

Le challenge pour les organismes dépendants du Cu est donc de réguler finement l'homéostasie de ce métal. Ils doivent obtenir des niveaux de Cu suffisants pour satisfaire leurs besoins, tout en contrôlant rigoureusement leur concentration intracellulaire en Cu afin d'éviter toute toxicité. Etant donné que la concentration en Cu dans l'environnement peut fluctuer au cours du temps, les bactéries ont développé des mécanismes afin de contrôler sa concentration intracellulaire.

3) Homéostasie du cuivre : un subtil équilibre

L'homéostasie métallique correspond à un équilibre entre l'import, le stockage et l'efflux. Ce contrôle est exigé par la dualité des métaux lourds à la fois essentiels à l'état de traces et toxiques lorsqu'ils sont présents en trop grande concentration. En ce qui concerne les concentrations en Cu en Wallonie par exemple, pour un cours d'eau non pollué, on parle d'une gamme allant du µg/l à quelques dizaines de µg/l (Pereira, 2007). Par contre, suite à la pollution, ces valeurs peuvent augmenter fortement atteignant parfois plusieurs g/l (Harrison *et al.*, 1984).

L'entrée du Cu dans les cellules bactériennes est assez peu documentée. On sait cependant que des porines, sont enchâssées dans la membrane externe et permettent une diffusion passive d'ions métalliques à travers cette membrane (par exemple OmpC et OmpF chez *E. coli*) (Nikaido & Vaara, 1985). Différents mécanismes sont donc mis en place par les bactéries afin d'éviter une trop grande accumulation de Cu à l'intérieur de la cellule. Parmi ces systèmes, les plus fréquents sont (i) la transformation de l'ion Cu^{+} en une forme moins toxique Cu^{2+} (oxydation), (ii) la complexation par des composés soufrés ou (iii) le transport du métal hors de la bactérie. Le Cu peut également être séquestré à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (Trevors & Cotter, 1990).

Le Cu présent dans le milieu peut être séquestré de manière extracellulaire grâce à la production d'exo-polysaccharides au niveau de la membrane externe. Ces composés sont capables de lier le Cu et de le maintenir « piégé » hors de la cellule via des interactions électrostatiques (Gonzalez *et al.*, 2010).

Dans une cellule, les ions métalliques ne sont pratiquement jamais trouvés sous la forme d'ions libres (Outter *et al.*, 2001) qui est toxique pour la cellule. Les cellules peuvent limiter la toxicité intracellulaire du Cu^{+} en l'éloignant de certains sites critiques grâce à des protéines chaperonnes (Osman & Cavet, 2008). Les chaperonnes à Cu sont des protéines qui permettent de « maintenir » le métal et de le diriger rapidement vers les compartiments spécifiques et les protéines nécessitant du Cu, telles que des métalloprotéines.

Au niveau du cytoplasme, le Cu^{+} est généralement complexé au glutathion ou d'autres métabolites, comme les métallothionéines, qui chélatent le Cu et l'empêchent de créer des dommages cellulaires (Macomber & Imlay, 2009).

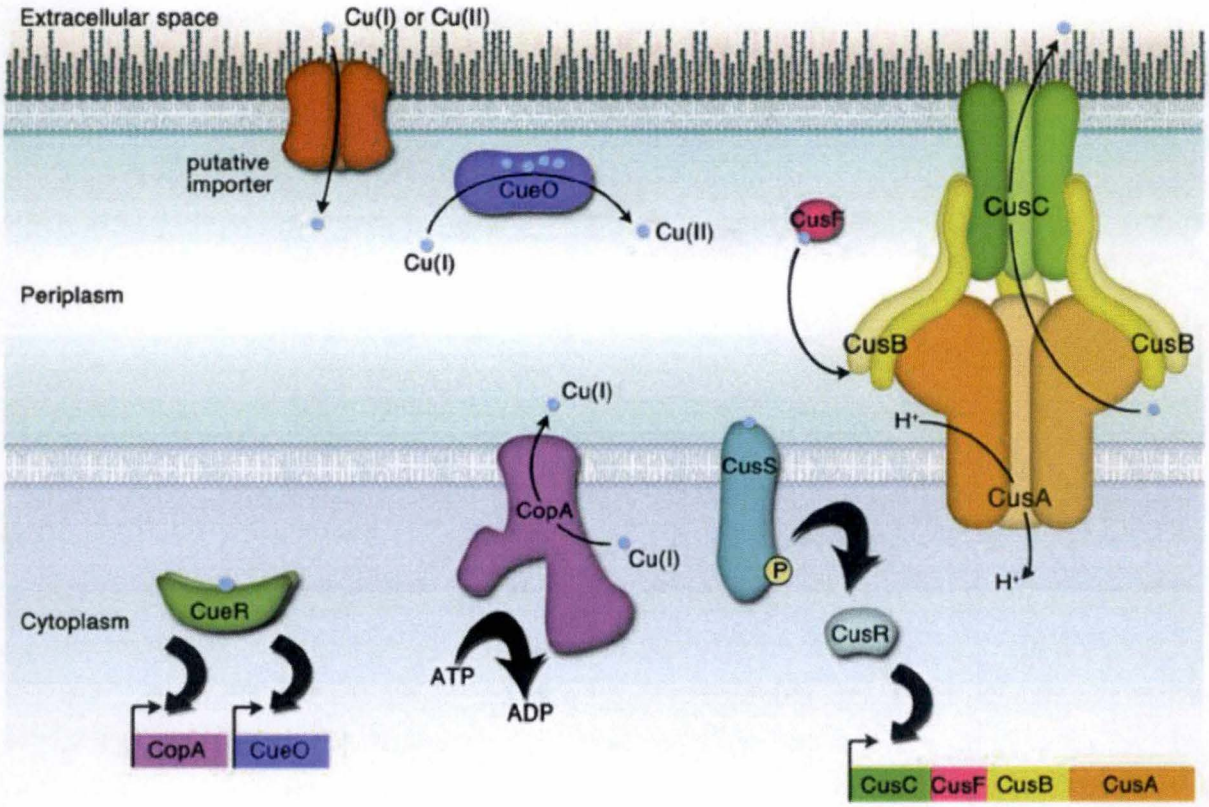


Figure 3 : Représentation schématique des systèmes Cus et Cue chez *E. coli* (Rensing & Grass, 2003)

Quand un excès d'ions métalliques est détecté dans le périplasme ou le cytoplasme, le métal est exporté vers le milieu extracellulaire. Certains transporteurs sont d'ailleurs exprimés constitutivement et participent à l'élimination du Cu, tels que CopA, une P_{1B}-type ATPase (Odermatt *et al.*, 1993). Les systèmes d'efflux ont en effet été décrits comme jouant un rôle crucial dans le traitement intracellulaire du Cu (Nies & Silver, 1995). C'est notamment le cas de la bactérie modèle *Escherichia coli* (*E. coli*), chez qui les trois systèmes principaux de détoxification du Cu ont été caractérisés : les systèmes Cue, Cus et Pco (Osman & Cavet, 2008).

4) Mécanismes principaux de détoxification du cuivre

a) Le système Cue

Le système Cue (Cu efflux) est le premier système mis en place pour faire face à une augmentation de la concentration intracellulaire en Cu. Il sert à la détoxification du Cu et est induit en cas de stress modéré ou élevé. Ce système comporte une protéine régulatrice CueR qui induit l'expression de deux gènes : *copA* et *cueO*. La protéine CopA est une P_{1B}-type ATPase qui permet l'export du Cu^+ du cytoplasme vers le périplasme et CueO est une multi-copper oxydase périplasmique qui participe à la transformation du Cu^+ en Cu^{2+}, moins toxique (Fig. 3) (Grass & Rensing, 2001 ; Rensing & Grass, 2003).

b) Le système Cus

Le second système utilisé pour la détoxification du Cu est le système Cus (Cu sensing). Il intervient en cas de stress plus important, lorsque le système Cue est saturé. Le système à deux composants CusR/S permet d'activer la transcription de l'opéron *cusCBAF* lorsque la concentration intracellulaire en Cu augmente. La chaperonne CusF lie le Cu et le délivre au complexe CusCBA. Celui-ci permet ensuite l'export de Cu hors de la cellule en une seule étape depuis le cytoplasme ou le périplasme (Fig. 3) (Franke *et al.*, 2003).

c) Le système Pco

Des études ont montré que des souches d'*E. coli* présentes dans le tube digestif de porcs nourris avec de la nourriture supplémentée en Cu présentaient une résistance accrue au métal (Rensing & Grass, 2003). Ces souches possèdent en fait un système supplémentaire de résistance au Cu porté par un plasmide, le système Pco (plasmid-borne copper resistance). Chez *E. coli*, celui-ci supporte les 2 premiers systèmes, Cue et Cus et est encodé par 7 gènes, *pcoABCDRSE* (Lee *et al.*, 2002).

Le système Pco est encore très peu caractérisé à l'heure actuelle. On sait cependant que PcoR et PcoS font partie d'un système à 2 composants, qui permet d'activer la transcription des autres gènes *pco* lorsque la concentration intracellulaire en Cu augmente (Brown *et al.*, 1995). PcoA est une multi-copper oxydase périplasmique (homologue de CueO), capable de détoxifier le périplasme en oxydant le Cu^{+} en Cu^{2+} (Rensing & Grass, 2003 ; Lawarée *et al.*, 2016). PcoB est une protéine de la membrane externe, qui jouerait un rôle de pompe à efflux permettant la sortie du Cu du périplasme vers le milieu extracellulaire (Lawarée *et al.*, 2016). PcoC lie le Cu^{+} dans le périplasme et le présente à PcoA qui oxyde ce Cu^{+} en Cu^{2+}. PcoD est une protéine de la membrane interne qui pourrait interagir avec PcoC (Lee *et al.*, 2002). Enfin, PcoE est une protéine périplasmique. Elle est nécessaire pour obtenir une résistance maximale et permettrait de séquestrer le Cu périplasmique avant l'induction complète du système Pco. Elle est contrôlée par CusR/S, alors que l'opéron *pcoABCD* est sous le contrôle de PcoR/S (Lee *et al.*, 2002).

5) Autres systèmes de résistance aux métaux lourds

À la fin de son mémoire, Gwennaelle Louis a réalisé un crible génétique sur une banque de mutants transpositionnels à l'aide du transposon Mini-Tn5 dans le but de trouver des mutants qui seraient plus sensibles au Cu que la souche CB15N sauvage de *C. crescentus*. Elle a pu identifier plusieurs candidats intéressants, parmi lesquels un *abc transporteur (CC_2244)*, une *glutathion S-transférase* et un régulateur transcriptionnel impliqué dans l'homéostasie du zinc, *cztR*. Dans cette étude, nous avons choisi de nous concentrer sur l'*abc transporteur*. En effet, certaines études ont montré que les ABC transporteurs étaient impliqués dans la résistance à d'autres métaux lourds que le Cu (Klein *et al.*, 2011). C'est pourquoi nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiel de ce candidat CC_2244 dans la résistance au Cu chez *Caulobacter crescentus*, la bactérie d'intérêt du laboratoire.

A. Les ATP-binding cassette transporteurs

I. Diversité des ABC transporteurs

Les ATP-binding cassette (ABC) transporteurs sont des protéines membranaires présentes chez les procaryotes, les archées mais aussi les eucaryotes (Holland *et al.*, 2003). Ils constituent vraisemblablement la superfamille de protéines la plus vaste (Tatusov *et al.*, 1996). En effet, 48 ABC transporteurs ont été identifiés chez l'Homme (Dean *et al.*, 2001) et 80 chez la bactérie *E. coli* (Saier *et al.*, 2000). Cette superfamille ABC est actuellement sous-divisée en 22 sous-familles d'importateurs procaryotes, 24 sous-familles d'exportateurs procaryotes et 10 sous-familles d'exportateurs eucaryotes (Saier *et al.*, 2000).

Certaines études ont montré que les ABC transporteurs sont intégrés dans la membrane interne des bactéries (Klein *et al.*, 2011). Ces protéines membranaires utilisent l'énergie cellulaire (ATP) pour transporter activement des ligands à travers les membranes. Elles jouent donc un rôle critique pour plusieurs processus cellulaires. En effet, via le transport de molécules de différentes tailles et structures (ions, sucres, acides aminés, peptides, lipides ou encore xénobiotiques et métaux), les ABC transporteurs interviennent dans le stockage de nutriments, l'élimination de déchets et substances toxiques, la génération d'énergie mais aussi la signalisation cellulaire. La plupart des ABC transporteurs sont hautement spécifiques, reconnaissant un nombre limité de substrats, mais d'autres, comme par exemple les MDR (multidrug resistance) ABC, transportent des substrats de natures très différentes.

II. Une structure conservée

Malgré la variété de substrats et les multiples processus dans lesquels ils sont impliqués, les ABC transporteurs comprennent un « noyau » conservé de 4 domaines : 2 domaines transmembranaires et 2 domaines cytosoliques, liant l'ATP (Young & Holland, 1999). Les 4 domaines peuvent être encodés comme des polypeptides séparés, comme c'est le cas pour de nombreux transporteurs bactériens (HisP chez *E.coli*) (Nikaido *et al.*, 1997) ou être contenus dans une seule chaine polypeptidique comme c'est le cas pour la majorité des ABC transporteurs eucaryotes (par exemple la glycoprotéine-P) (Lu *et al.*, 2001). Cependant, beaucoup de configurations sont possibles (Fig. 4) (Linton & Higgins, 1998).

II-a Les domaines de liaison au nucléotide : des moteurs conservés

Ces derniers, aussi connus comme les « ATP-binding cassettes » sont responsables de l'activité catalytique du transporteur et sont la marque distinctive des protéines ABC, d'où le nom de la superfamille (Young & Holland, 1999). Ce sont les « moteurs » du transporteur. En effet, ils lient l'ATP et catalysent son hydrolyse, fournissant l'énergie nécessaire au transport actif et unidirectionnel du soluté à travers la membrane interne (Walker *et al.*, 1982).

Les séquences primaires de ces domaines liant le nucléotide (NBD : *nucleotide-binding domain*) sont hautement conservées. On retrouve donc plusieurs motifs qui ont des fonctions spécifiques (Fig. 5) (Jones & George, 2004). Tout d'abord, on retrouve les motifs Walker A (ou 'P-loop') et Walker B qui forment la cavité de liaison du nucléotide. Ceux-ci sont communs à toutes les protéines liant l'ATP. Les autres séquences conservées sont les motifs 'Signature', 'Glutamine Loop' et 'Histidine Loop'. Le motif 'LSGGQ', qui constitue la « signature » des ABC transporteurs, interviendrait dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Ces 3 motifs sont donc impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP.

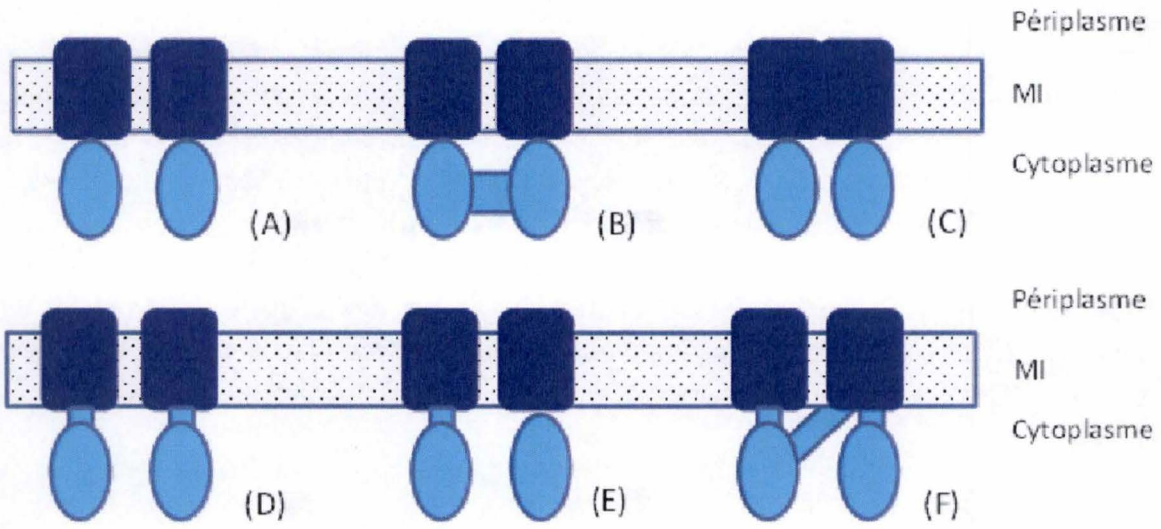


Figure 4 : Représentation schématique des différentes organisations des ABC transporteurs (A) Ils peuvent être encodés comme 4 polypeptides séparés ; (B) Les 2 NBD (nucleotide- binding domain) peuvent être fusionnés entre eux ; (C) Les 2 TMD (transmembrane domain) peuvent être fusionnés entre eux ; (D) Un TMD fusionné à un NBD, avec l'ABC transporteur hybride fonctionnant comme un homodimère ; (E) Un TMD fusionné à un NBD, avec l'autre TMD et l'autre NBD comme polypeptides séparés ; (F) Les 4 domaines fusionnés en un seul polypeptide (Linton & Higgins, 1998).

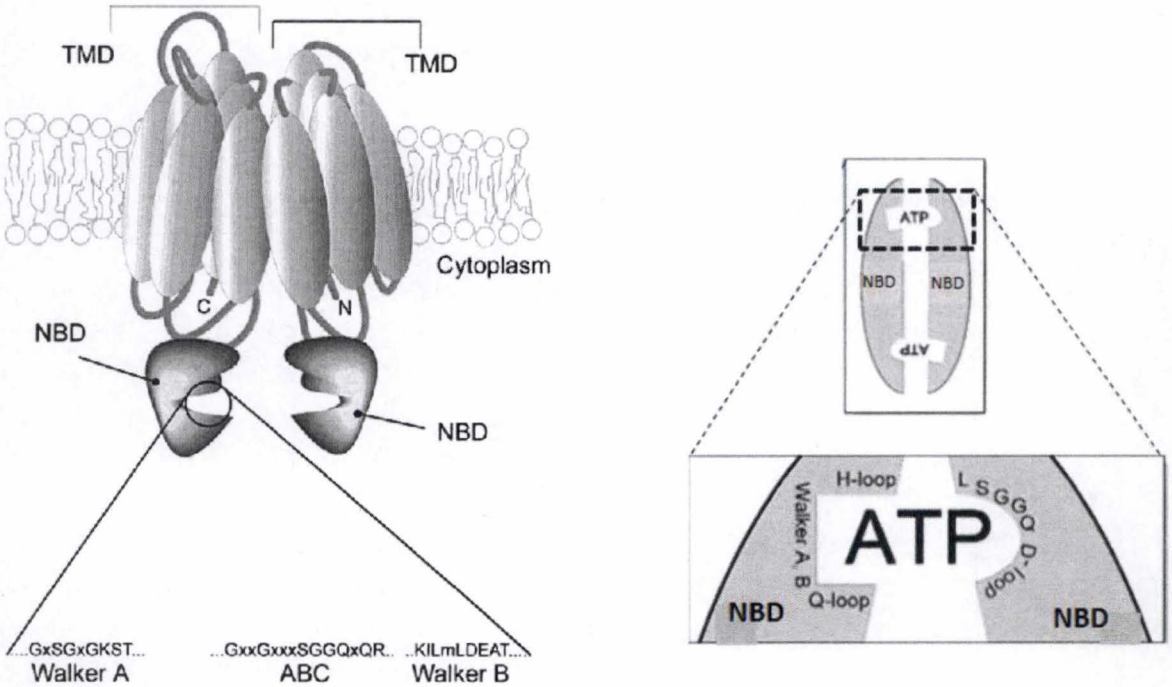


Figure 5 : Représentations schématiques des domaines de liaison à l'ATP (NBD : nucleotide-binding domain) comprenant différents motifs consensus : Walker A, Walker B, ABC Signature, D-loop et H-loop (Walker *et al.*,1982)

Les NBD fonctionnent sous forme de dimère, interagissant en tête à queue (Fig. 6). Au sein d'un transporteur fonctionnel, la dimérisation des NBD crée 2 poches de fixation pour l'ATP. En effet, un site de fixation comprend les motifs Walker A et Walker B d'un NBD, en association avec la "signature ABC" de l'autre NBD (Fig. 6) (Smith *et al.*, 2002).

D'autres résidus conservés semblent jouer un rôle important dans le mécanisme catalytique des NBD. Tout d'abord un résidu glutamate (Q-loop), impliqué dans le contact entre les 2 NBD. Et enfin un résidu histidine (H-loop) contribuant à la réaction catalytique (Hollenstein *et al.*, 2007). Tous ces motifs conservés sont essentiels au bon fonctionnement de l'ABC transporteur. Il a été montré que des mutations dans ces régions réduisent fortement ou même empêchent le transport et l'activité ATPase de ces protéines (Walker *et al.*, 1982).

II-b Les domaines transmembranaires

Les 2 domaines transmembranaires (TMD) vont constituer le site de liaison du substrat et surtout la perméase du transporteur. Ils contiennent de multiples hélices alpha enchâssées dans la bicouche lipidique et forment donc la voie de translocation du substrat à travers la membrane. Ils déterminent également la spécificité de liaison du substrat. C'est pourquoi, contrairement aux NBD, les TMD sont très différents d'un transporteur à l'autre. En effet, ils varient considérablement au niveau de leur séquence primaire, leur longueur, leur architecture mais aussi leur nombre d'hélices alpha transmembranaires. Le plus souvent, chacun des 2 TMD est composé de 6 hélices TM, mais cela peut varier. Alors que les ABC exportateurs contiennent un noyau conservé de 2x6 hélices TM, les ABC importateurs comportent entre 2x5 et 2x10 hélices TM (Fig. 7) (Hollenstein *et al.*, 2007).

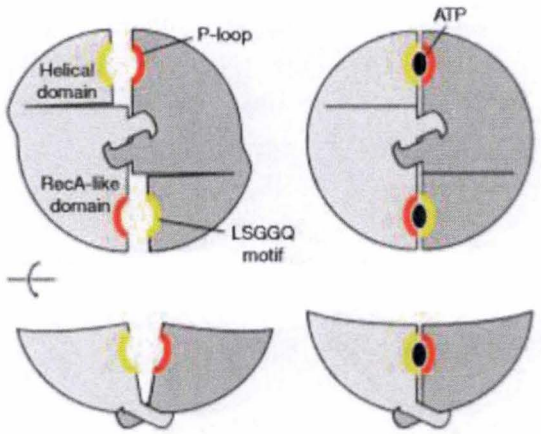


Figure 6 : Modèle de l'interaction entre les motifs Walker A (P-loop), Walker B et la Signature ABC (LSGGQ) lors de la dimérisation des domaines de liaison à l'ATP (NBD) (Smith *et al.*, 2002)

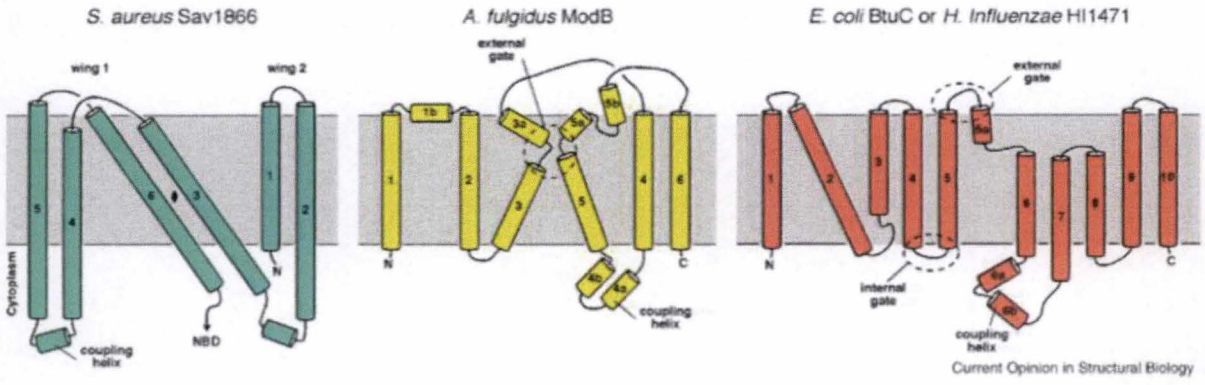


Figure 7 : Schéma représentant la configuration des domaines transmembranaires (TMD) de différents ABC transporteurs, notamment Sav1866 chez *S. aureus*, ModB chez *A. fugidus*, BtuC chez *E. coli* (Hollenstein *et al.*, 2007)

III. Fonctions d'import et d'export

Chez les bactéries, les ABC transporteurs catalysent l'absorption de nutriments essentiels ou l'extrusion de toxines ou d'agents antimicrobiens. On distingue donc 2 types principaux d'ABC transporteurs en fonction de la direction du transport : les importateurs et les exportateurs (Fig. 8) (Locher, 2008).

III-a Importateurs ABC

Les importateurs ABC sont presque exclusivement présents chez les procaryotes (Davidson *et al.*, 2008). Ils permettent l'entrée dans le cytoplasme de petites molécules hydrophiles, telles que des nutriments, des sucres, des acides aminés (Davidson & Chen, 2004) mais aussi des chélateurs (hème et vitamine B_{12}) (Fig. 8) (Griffiths & Williams, 1999) et des métaux (Klein *et al.*, 2011)

En plus des 4 domaines principaux, les importateurs ABC requièrent une protéine extra-cytoplasmique de liaison (SBP) qui a une forte affinité pour le substrat transporté (de 0,01 à 1 µM) et le délivre à la face externe du transporteur, vers les TMD. Chez les bactéries gram négatives, cette protéine est périplasmique, alors que chez les gram positives, elle est attachée à la face externe de la membrane cellulaire (Fig. 9) (Higgins *et al.*, 2001).

Une caractéristique commune à tous les importateurs est la présence de 10 à 20 hélices alpha transmembranaires au niveau des TMD. Dans les ABC importateurs, les TMD et les NBD sont presque toujours des chaines polypeptidiques indépendantes qui se rassemblent pour former un transporteur fonctionnel.

a) Import de métaux

Certains ABC transporteurs sont impliqués dans l'import de métaux. Ces ABC transporteurs importent seulement les métaux essentiels (Fe, Zn, Mn, Co) pour lesquels ils ont une haute affinité (Klein *et al.*, 2011). En effet, il serait désavantageux de dépenser de l'énergie dans l'import de composés toxiques non essentiels. Grâce à des interactions avec leur SBP et des récepteurs de la membrane externe, ils interviennent dans l'import des métaux sous leur forme ionique, notamment Mn^{2+} et Zn^{2+} (Rukhman *et al.*, 2005 ; Klein *et al.*, 2011). Ils peuvent aussi transporter des complexes formés d'un métal de transition lié à un chélateur tel que les sidérophores, ou de la vitamine B_{12} respectivement dans le cas du Fe (par exemple BtuCD chez *E. coli*) et du Co (Klein *et al.*, 2011).

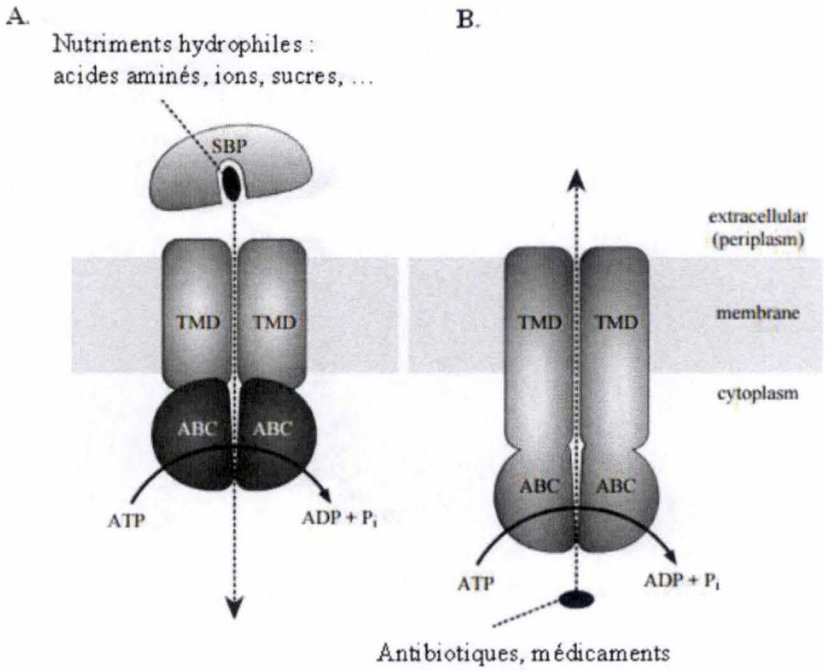


Figure 8 : Représentation schématique de la fonction des ABC transporteurs. (A) Les importateurs ABC qui requièrent une SBP, acheminant les molécules hydrophiles dans le canal de translocation formé par les 2 TMD ; (B) Les exportateurs ABC ont typiquement leurs TMD fusionnés aux NBD et expulsent des antibiotiques et médicaments hors du cytoplasme (Locher, 2008).

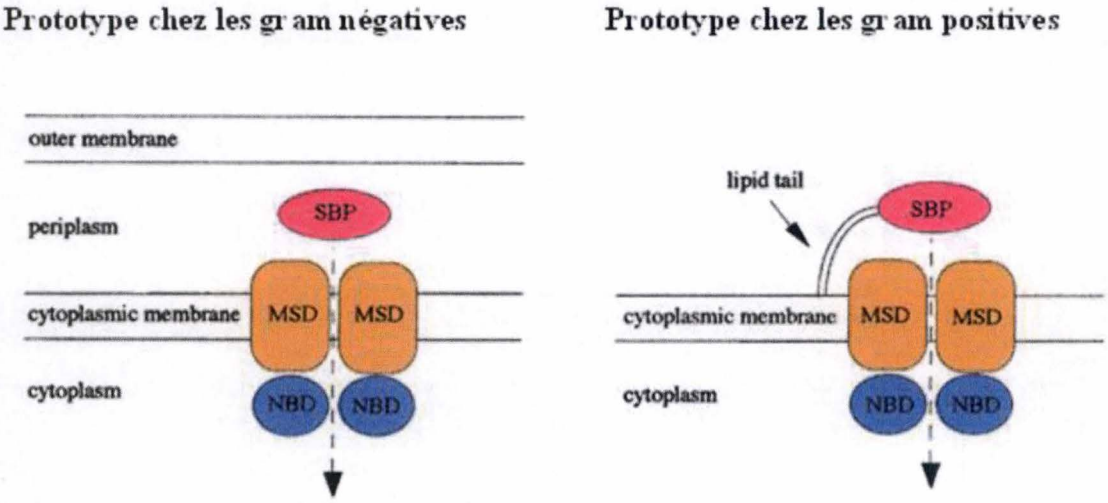


Figure 9 : Représentation schématique de la localisation de la protéine de liaison au substrat (SBP) chez les bactéries gram négatives et gram positives (Higgins *et al.*, 2001).

III-b Exportateurs ABC

Les ABC transporteurs interviennent aussi dans l'efflux de substrats très différents tels que des lipides, polysaccharides, peptides ou métaux (Jones & George, 2004 ; Bovet *et al.*, 2007 ; Ortiz *et al.*, 1992). Ils peuvent aussi exporter des substances toxiques telles que des toxines et des agents antibactériens (Dassa & Bouige, 2001). Contrairement à la fonction d'import qui semble exclusive aux procaryotes (Davidson *et al.*, 2008), la fonction d'export des ABC transporteurs a aussi été décrite chez des espèces eucaryotes (Doeven *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'export de métaux lourds par les ABC transporteurs, à notre connaissance rien n'a encore été démontré expérimentalement chez les procaryotes. Par contre, des études menées chez les eucaryotes, notamment *Arabidopsis thaliana* (Bovet *et al.*, 2007) et *Schisosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1992), démontrent que des ABC transporteurs sont impliqués dans l'export du Cd, conférant une résistance à ce métal lourd. Dans le cas de *A. thaliana* il s'agit de l'ABC transporteur AtPDR8 et dans le cas de *S. pombe* il s'agit de HMT1.

Les ABC exportateurs recrutent leur substrat directement à partir du cytoplasme ou du feuillet interne de la bicouche lipidique et le transportent du cytoplasme vers le périplasme.

La plupart du temps dans les exportateurs bactériens, un TMD est fusionné à un NBD, générant un « demi-transporteur » qui forme un homodimère ou un hétérodimère pour générer une unité complète fonctionnelle (Hollenstein *et al.* 2007).

IV. Mécanisme moléculaire de transport des ABC transporteurs

Les mécanismes détaillés grâce auxquels les ABC transporteurs transportent les solutés à travers les membranes sont peu clairs. En effet, suite à la diversité de substrats reconnus et transportés par les ABC transporteurs, les modèles de liaison et de translocation se multiplient. Il semble difficile de concevoir un mécanisme catalytique unique face à cette variété de transporteurs. Les structures 3D de certains transporteurs suggèrent néanmoins qu'il y aurait un mécanisme commun aux importateurs et exportateurs (Dawson *et al.*, 2007).

IV-a Cycle catalytique

Le modèle le plus répandu à l'heure actuelle pour décrire le mécanisme moléculaire des ABC transporteurs est le modèle de l'« ATP switch » (Fig. 10) (Higgins *et al.*, 2004). Ce modèle a été baptisé ainsi car la liaison de l'ATP constituerait l'étape la plus importante énergétiquement parlant, plutôt que l'hydrolyse de l'ATP.

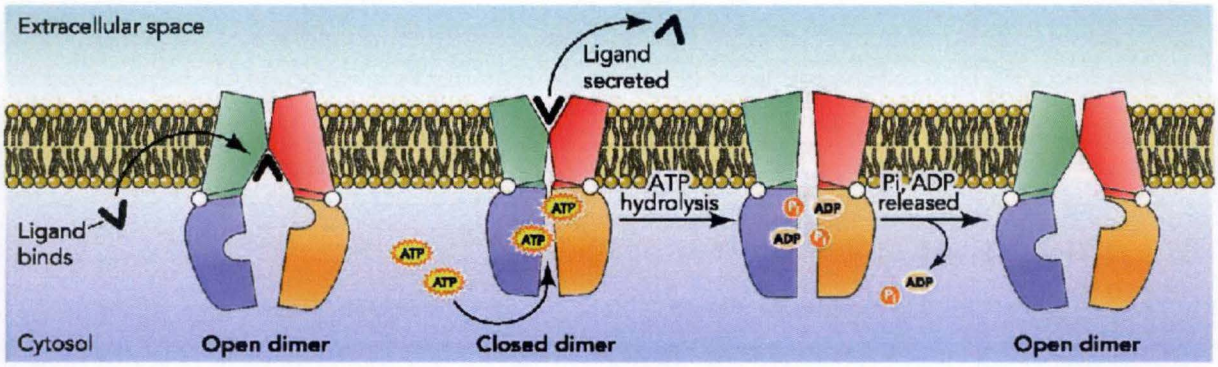


Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire permettant le transport de substrats par les ABC transporteurs. Modèle de l'ATP-switch (Higgins *et al.*, 2004)

Tout d'abord, le cycle de transport du substrat débute par sa liaison aux TMD, qui se trouvent en conformation ouverte à l'état basal. Cette fixation sur un site de haute affinité au niveau des TMD induit un changement conformationnel des TMD qui se répercute sur les NBD. Cette modification facilite la fixation de l'ATP et la dimérisation des NBD. Ce dimère de NBD passe alors d'une conformation « ouverte » à une conformation « fermée » dans laquelle les deux molécules d'ATP sont coincées à l'interface des deux NBD. Ensuite, le rapprochement des NBD, en conformation « fermée » entrainerait à son tour une modification majeure au sein des TMD et activerait le transport du substrat. Le site de fixation du substrat localisé au niveau des TMD et faisant maintenant face au périplasme perdrait alors sa haute affinité pour le substrat. Enfin, l'hydrolyse de l'ATP entrainerait la dissociation du dimère de NBD et entrainerait le retour du transporteur dans un état basal, qui se conclurait par le relargage d'ADP et de phosphate inorganique (P_i) dans le cytoplasme (Lu *et al.*, 2005). Cela restaure le transporteur dans une position où le dimère de NBD est en conformation ouverte, tandis que le site de fixation du substrat au sein des TMD est accessible du côté cytoplasmique, présentant une haute affinité pour le substrat, prêt pour un nouveau cycle catalytique.

Ce mécanisme est également applicable aux importateurs. Cependant l'implication de la SBP dans le cycle de transport des importateurs leur confère probablement des caractéristiques spécifiques.

À l'heure actuelle, de nombreux détails concernant le mécanisme moléculaire des ABC transporteurs restent méconnus ou controversés. Notamment en ce qui concerne la stœchiométrie, le nombre de molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transportée est un sujet très discuté. En effet, des données contradictoires existent à ce sujet puisqu'on parle de stœchiométrie allant de 1 à 50 molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transportée (Patzlaff *et al.*, 2003).

La distribution ubiquitaire de ces protéines et la conservation exceptionnelle de leur structure suggèrent qu'elles jouent un rôle important dans l'homéostasie cellulaire de tous les organismes vivants. En outre, ces transporteurs semblent essentiels à la survie dans différentes conditions environnementales.

Certains des mécanismes de résistance aux métaux mentionnés ci-dessus (Cus, Cue, Pco et ABC transporteurs) sont conservés chez l'alpha-protéobactérie aquatique *C. crescentus*.

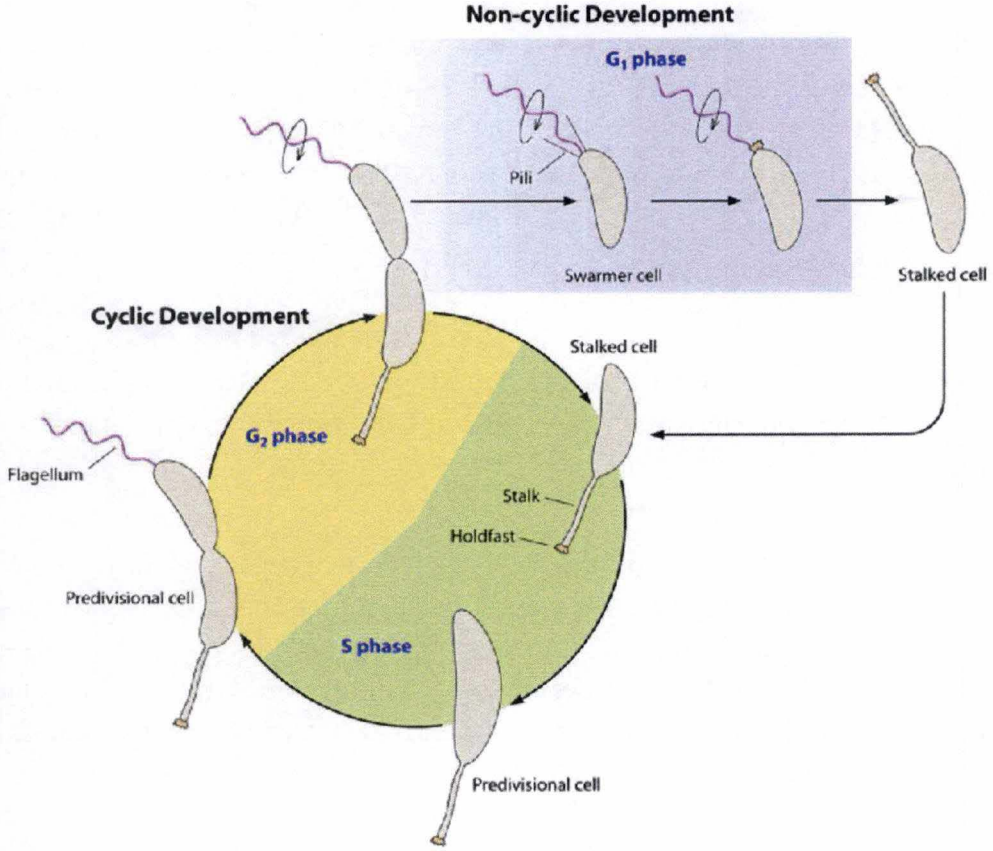


Figure 11 : Cycle cellulaire de *C. crescentus* (Curtis & Brun, 2010)

3. *Caulobacter crescentus*

C. crescentus est une bactérie gram négative oligotrophique. On la retrouve en tant qu'espèce pionnière dans des environnements pollués par les métaux lourds, dont le Cu. Dans son environnement naturel, *C. crescentus* est donc confrontée à des conditions parfois difficiles, suggérant qu'elle a dû mettre en place certains mécanismes pour détecter et répondre spécifiquement à différents stress. Dans ce contexte, il semble intéressant d'étudier cette bactérie afin de mieux comprendre quels sont les systèmes de résistance qu'elle met en place afin de survivre dans des environnements pollués en Cu.

C. crescentus est étudiée depuis de nombreuses années en raison de son cycle cellulaire élaboré (Fig. 11) (Curtis & Brun, 2010). Celui-ci est dit dimorphique car il génère 2 types de cellules filles : une cellule flagellée, mobile, et une cellule pédonculée, ancrée à son substrat. La cellule flagellée est capable de se déplacer dans le milieu pour chercher un endroit optimal à sa survie avant de se différencier en cellule pédonculée. Lorsque la cellule pédonculée s'allonge et réplique son ADN, elle devient une cellule pré-divisionnelle, qui se divise de manière asymétrique générant à nouveau une cellule flagellée et une cellule pédonculée (Curtis & Brun, 2010). Dans ce contexte, le cycle cellulaire particulier de *C. crescentus* pourrait constituer un avantage quand la bactérie rencontre un stress, en fournissant de multiples stratégies pour faire face à ce stress (Lawarée *et al.*, 2016).

La présence de métaux lourds dans les sols et l'eau fait aujourd'hui l'objet d'une préoccupation grandissante, notamment à cause de sa toxicité, mais aussi parce que son utilisation généralisée participe à la sélection de souches bactériennes résistantes. Le Cu est en effet utilisé pour beaucoup d'applications en tant que biocide. En plus de son utilisation industrielle et la pollution inhérente qui en résulte, le Cu est utilisé médicalement pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques comme alternative aux médicaments et antibiotiques (Chaturvedi & Henderson, 2014). Ce métal est aussi couramment utilisé en agriculture pour prévenir les maladies telles que le mildiou, qui peuvent détruire les cultures (Komarek *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il semble intéressant de comprendre les divers mécanismes qui peuvent être utilisés pour l'homéostasie du Cu chez un organisme comme *C. crescentus*.

Objectifs

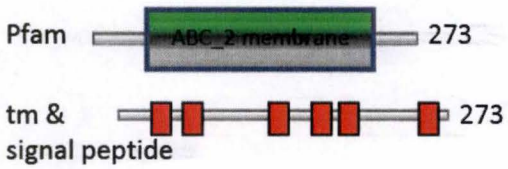
Objectifs

La résistance au Cu a précédemment été étudiée dans le laboratoire dans le cadre de la thèse de Sébastien Gillet et d'Emeline Lawarée. Ils se sont intéressés au système PcoA/B de *C. crescentus*, composé des 2 protéines PcoA et PcoB. PcoA est une multi-copper oxydase périplasmique qui oxyde le Cu^{+} en Cu^{2+}, moins toxique. PcoB est une protéine de la membrane externe, qui fonctionnerait comme une pompe à efflux, pour expulser le Cu hors de la cellule. Ils ont montré que ces protéines participent ensemble à la résistance au Cu de *C. crescentus*. Mon mémoire a pour but d'identifier et de caractériser de nouveaux systèmes de résistance et d'homéostasie du Cu chez la bactérie *C. crescentus*. Tout d'abord, nous avons abordé cette question par une approche avec *a priori*. À la fin de son mémoire au sein du laboratoire, Gwennaelle Louis a réalisé un crible génétique sur une banque de mutants transpositionnels dans le but d'identifier des mutants qui seraient plus sensibles au Cu que la souche sauvage CB15N de *C. crescentus*. Plusieurs candidats ont pu être identifiés : une ABC transporteur perméase, une gluthation S-transférase et un régulateur transcriptionnel impliqué dans l'homéostasie du zinc, cztR. Dans cette étude, nous avons choisi de nous concentrer sur l'ABC transporteur perméase (ABCt perméase) (encodée par le gène *CC_2244*). En effet, la structure hautement conservée des ABC transporteurs, qui semble être présente chez tous les organismes vivants, suggère qu'ils pourraient jouer un rôle important dans l'homéostasie cellulaire, notamment dans le transport de métaux lourds.

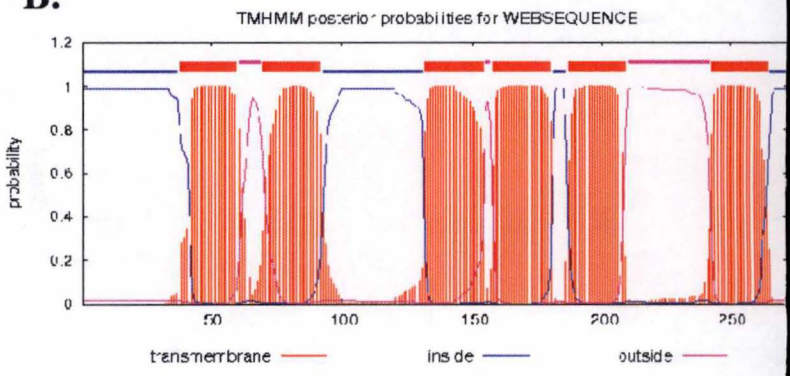
Cette étude a donc pour but de comprendre quel est le rôle de l'ABCt perméase CC_2244 dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*. Cela permettrait de mieux comprendre la réponse au stress en Cu de cette bactérie. De manière plus générale, et au vu de la conservation de ces protéines, cela permettrait d'en apprendre davantage sur les rôles des ABC transporteurs dans la résistance aux métaux lourds chez les bactéries.

Résultats et Discussion

A.



B.



C.

Sequences producing significant alignment :

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E value	Identity
multidrug ABC transporter permease (*Caulobacter vibrioides*) (CC_2244)	544	544	100%	0.0	100%
sugar ABC transporter permease (*Caulobacter vibrioides*) (CC_3372)	150	150	90%	1e-45	33%

D.

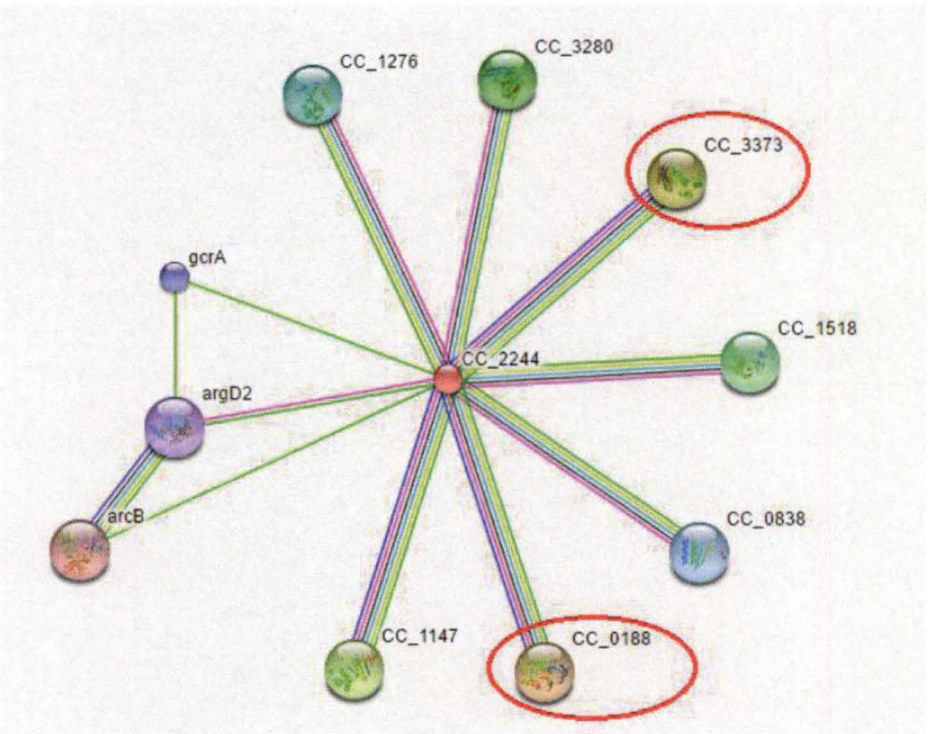


Figure 12 : Résultats et prédictions *in silico*. (A) Prédiction des domaines de la protéine CC_2244 de *C. crescentus* (JACKHMMER) ; (B) Prédiction de la localisation des domaines de la protéine CC_2244 de *C. crescentus* (TMHMM) ; (C) Résultat du blast pour la séquence protéique de l'ABCt de la CB15N contre le génome de la CB15N (Blast Pubmed) ; (D) Interactions fonctionnelles prédites entre CC_2244 (ABCt perméase) et d'autres protéines (base de données String).

Résultats et Discussion

1. Analyses *in silico* de l'ABC transporteur perméase CC_2244

En premier lieu, une analyse bio-informatique a été réalisée sur la séquence protéique de l'ABCt perméase afin d'essayer de prédire ses structures secondaire et tertiaire, ses domaines, son activité ainsi que sa localisation dans la souche CB15N de *C. crescentus*. Ces prédictions ont été obtenues non seulement grâce aux propriétés physico-chimiques inhérentes à la structure primaire de la protéine, mais aussi grâce aux homologues caractérisés dans d'autres espèces bactériennes. Le poids moléculaire de la protéine CC_2244 est d'environ 30 kDa. Elle est principalement composée de 6 hélices alpha et possède 6 régions transmembranaires (Fig. 12A-12B). Elle est annotée comme ABCt perméase et appartiendrait à la famille ABC-2 des systèmes de transport. Cette famille regroupe des exportateurs contenant une protéine membranaire intégrale de type ABC-2 comportant 6 régions transmembranaires qui formerait soit un canal homodimérique soit un hétérodimère en s'associant avec une autre protéine. Ainsi, au point de vue de la localisation subcellulaire, notre hypothèse est que la protéine soit ancrée en membrane interne, car beaucoup de protéines homologues sont localisées à cet endroit.

Des analyses complémentaires montrent qu'il pourrait y avoir une duplication du gène *ABCt* (*CC_2244*) dans le génome de *C. crescentus*. Le gène *CC_3372* semble en effet être un paralogue de *CC_2244* (Fig. 12C). *CC_3372* est prédit pour encoder une ABCt perméase et est en opéron avec le gène *CC_3373*, prédit pour encoder une protéine ABC ATP-binding. Afin d'identifier des interactants potentiels de notre protéine, nous avons utilisé un outil de prédiction en ligne, *String*. CC_2244 est prédite pour interagir avec de nombreux autres ABC transporteurs (Fig. 12D). Parmi ceux-ci, se retrouvent premièrement deux ATPases : la protéine ATP-binding CC_3373 et la protéine ATP-binding CC_0188, mais aussi comme attendu la perméase CC_3372. De plus, il s'avère que la protéine CC_3372 interagisse avec les deux mêmes protéines que CC_2244. Une hypothèse serait que notre protéine d'intérêt forme un hétérodimère avec la perméase CC_3372 pour former le canal de l'ABC transporteur. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'ABC transporteur fonctionnel pourrait être composé d'un dimère d'hétérodimères (4 protéines différentes, 2 perméases et 2 ABC). Cependant, les interactions prédites par *String* se basent sur des expériences réalisées sur des protéines homologues présentes dans l'organisme eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*. Il serait donc intéressant de vérifier ces interactions protéiques expérimentalement chez *C. crescentus*.

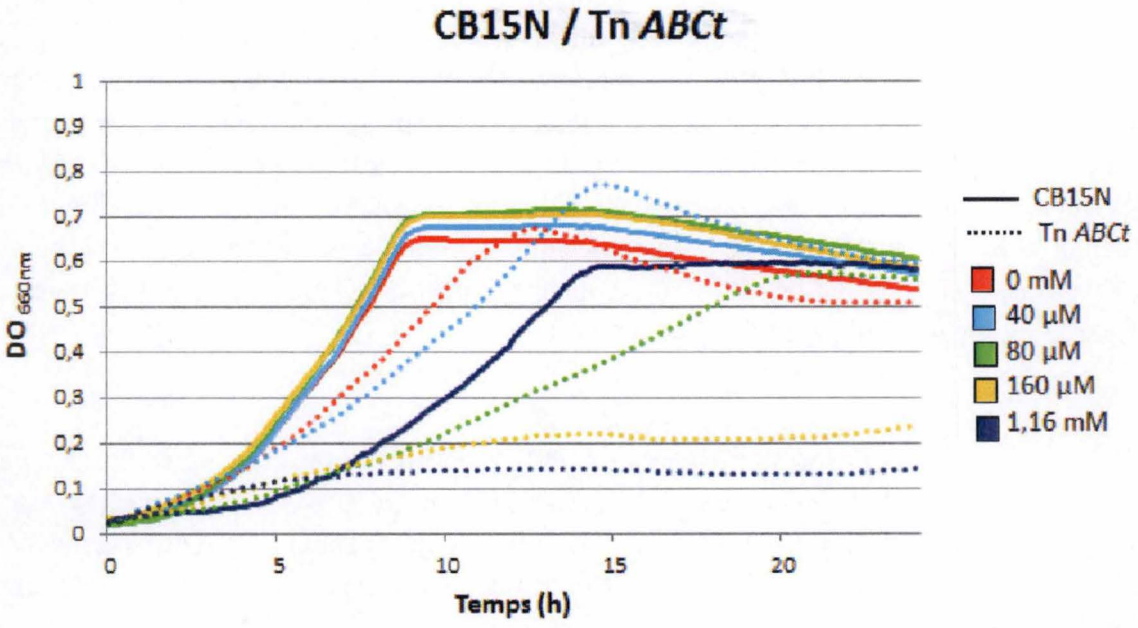


Figure 13 : Courbes de croissance de la souche sauvage CB15N et du mutant transpositionnel (Tn *ABCt*) en condition contrôle (0 mM de Cu) et traitée avec 40 µM, 80 µM, 160 µM et 1,16 mM de Cu.

2. Quel est le rôle de cette ABC transporteur perméase dans la résistance au Cu chez *C. crescentus* ?

A. Tests sur le mutant transpositionnel

Afin de comprendre quel rôle joue l'ABCt perméase dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*, nous avons tout d'abord cherché à évaluer sa capacité de croissance face à un stress en Cu. La souche sauvage CB15N, et le mutant transpositionnel (Tn *ABCt*) ont été mis en culture dans du milieu pauvre et défini (HIGG) en présence de différentes concentrations en $CuSO_4$ allant de 0 mM à 1,16 mM. Nous avons ensuite comparé les profils de croissance durant 24 h. Dans le laboratoire, il a été préalablement montré qu'une concentration en Cu de 1,16 mM avait un impact modéré sur la croissance de la souche sauvage (Lawarée *et al.*, 2016). C'est pourquoi cette concentration sera utilisée dans le reste de cette étude, en tant que condition de stress modéré.

Le mutant (Tn *ABCt*) est plus sensible au Cu que la souche sauvage (Fig. 13). Dans la souche sauvage, la vitesse de croissance n'est que légèrement impactée à 1,16 mM, alors que la croissance de la souche mutante est déjà affectée à une concentration en Cu de 80 µM. L'insertion du transposon dans le gène *ABCt* affecte probablement l'expression ou la fonction de l'ABCt perméase, sensibilisant dès lors le mutant au Cu.

Ces premiers résultats montrent qu'à 80 µM et après 15 h d'exposition au Cu, la souche mutante atteint une DO_{660nm} de 0,4. Ce profil de croissance est similaire à ce que l'on a observé précédemment dans le laboratoire au niveau de la souche CB15N. Pour cette raison, nous avons décidé de poursuivre nos futures expériences avec la concentration en Cu de 80 µM, considérant celle-ci comme notre condition typique de stress ayant un impact modéré sur la croissance du mutant Tn *ABCt* .

B. Création d'un délétant propre pour *CC_2244*

Afin de confirmer que les effets observés dans le mutant transpositionnel sont bien dus uniquement à l'invalidation du gène *ABCt* et non à un effet collatéral lié au transposon, un délétant propre (KO) pour ce gène a été créé au moyen d'une recombinaison homologue en 2 étapes au locus (cf. Matériels et Méthodes). Après l'obtention de cette souche KO, nous avons mesuré sa croissance en présence de différentes concentrations en Cu. La comparaison des courbes de croissance des 2 souches (Tn *ABCt* et Δ*ABCt*) révèle des comportements très similaires dans toutes les conditions testées (Fig. 14). Cela indique que le phénotype du mutant Tn *ABCt* est spécifique de la disruption du gène *ABCt* par le transposon Mini-Tn5.

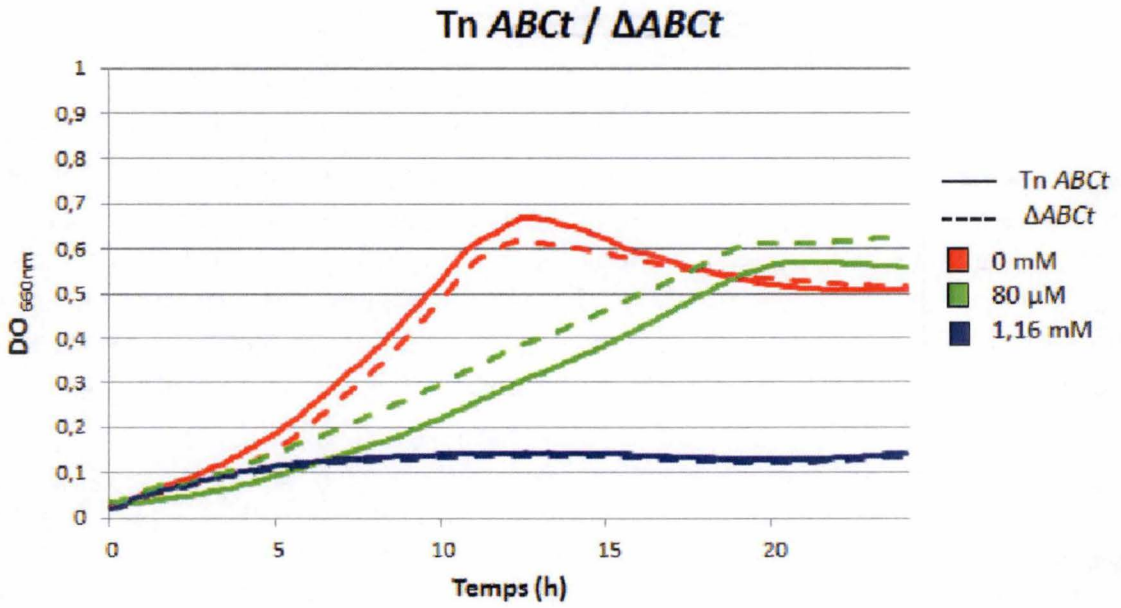


Figure 14 : Courbes de croissance du mutant transpositionnel (Tn *ABCt*) et du délétant propre (Δ*ABCt*) en condition contrôle (0 mM de Cu) et traitée avec 80 µM et 1,16 mM de Cu.

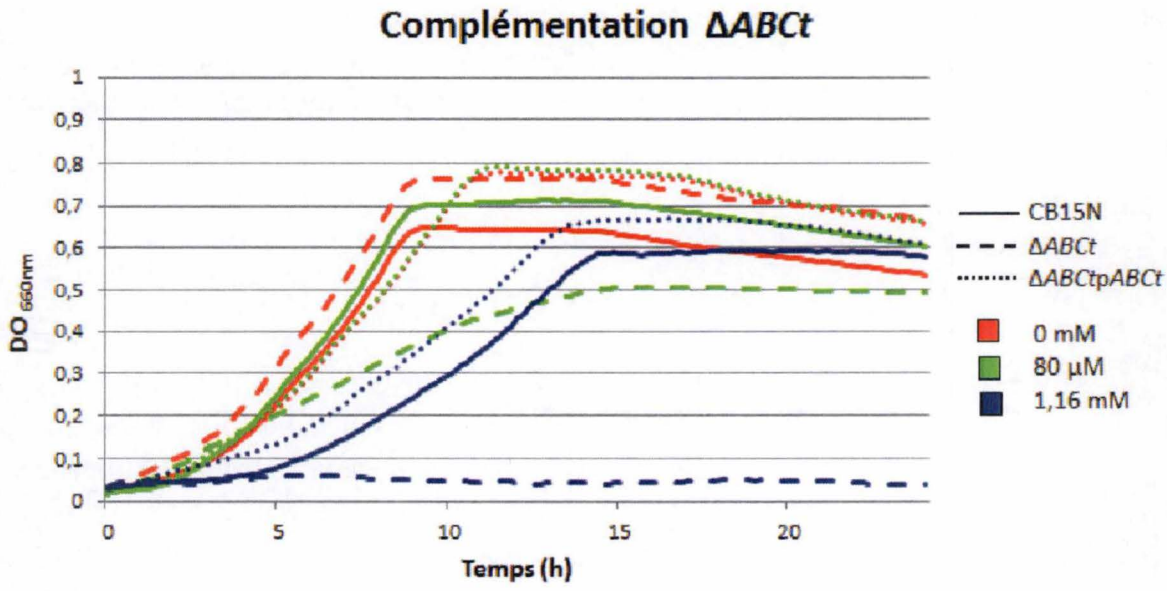


Figure 15 : Courbes de croissance de la souche KO (Δ*ABCt*) portant une copie de l'*ABCt* sur le plasmide pMR10, traitées avec différentes concentrations en Cu.

C. Complémentation de la souche délétante Δ*ABCt*

Afin d'éliminer l'hypothèse que le phénotype observé soit dû à des effets polaires, nous avons introduit une copie plasmidique de ce gène dans le mutant Δ*ABCt*. La souche Δ*ABCt* a été transformée avec le plasmide réplicatif pMR10, contenant une copie du gène *ABCt* en trans (cf. Matériels et Méthodes). Tout d'abord, une expression ectopique de l'*ABCt* sous le contrôle du promoteur constitutif *lac* (pLac) a été réalisée. Aux différentes concentrations testées, il semble que la souche KO portant une copie de l'*ABCt* sur le pMR10 parvienne à restaurer le phénotype de la souche sauvage et résiste même mieux à un stress en Cu (Fig. 15). Ce phénomène est peut-être dû à l'utilisation du pLac. Etant un promoteur fort, il pourrait entrainer une surexpression de l'ABCt perméase. Cette surexpression permettrait à *C. crescentus* de mieux faire face à un stress en Cu. Cela soulignerait l'implication de l'ABCt perméase dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*. Cette hypothèse pourrait être testée par exemple en mesurant l'activité transcriptionnelle par qRT-PCR et au niveau protéique par immunoblot.

D. Sensibilité du mutant Δ*ABCt* à d'autres métaux que le Cu

Afin de s'assurer que la sensibilité accrue au Cu du mutant Δ*ABCt* est bien spécifique à ce métal, nous avons testé sa croissance en présence d'autres métaux. Nous avons choisi le nickel (Ni), le manganèse (Mn), le zinc (Zn) et le fer (Fe). Sur base d'expériences similaires réalisées précédemment au sein du laboratoire, nous avons déterminé des gammes de concentrations pour chaque métal testé. Ainsi pour le $NiSO_4$, nous avons testé des concentrations entre 1 mM et 1,7 mM, pour le $MnSO_4$ entre 2 mM et 3 mM, pour le $ZnSO_4$ entre 0,96 mM et 1,5 mM, et enfin pour le $FeCl_3$ entre 1,6 mM et 2 mM (Fig. 16).

Aucune différence significative ne peut être observée entre la croissance de la souche mutante Δ*ABCt* et celle de la souche sauvage lorsque celles-ci sont soumises à un stress aux métaux lourds autres que le Cu (Ni, Mn, Zn et Fe). Ces résultats suggèrent que la plus grande sensibilité du mutant au Cu est exclusive à ce métal, et semblent donc indiquer que l'ABCt perméase possède principalement une activité en lien avec la résistance au Cu.

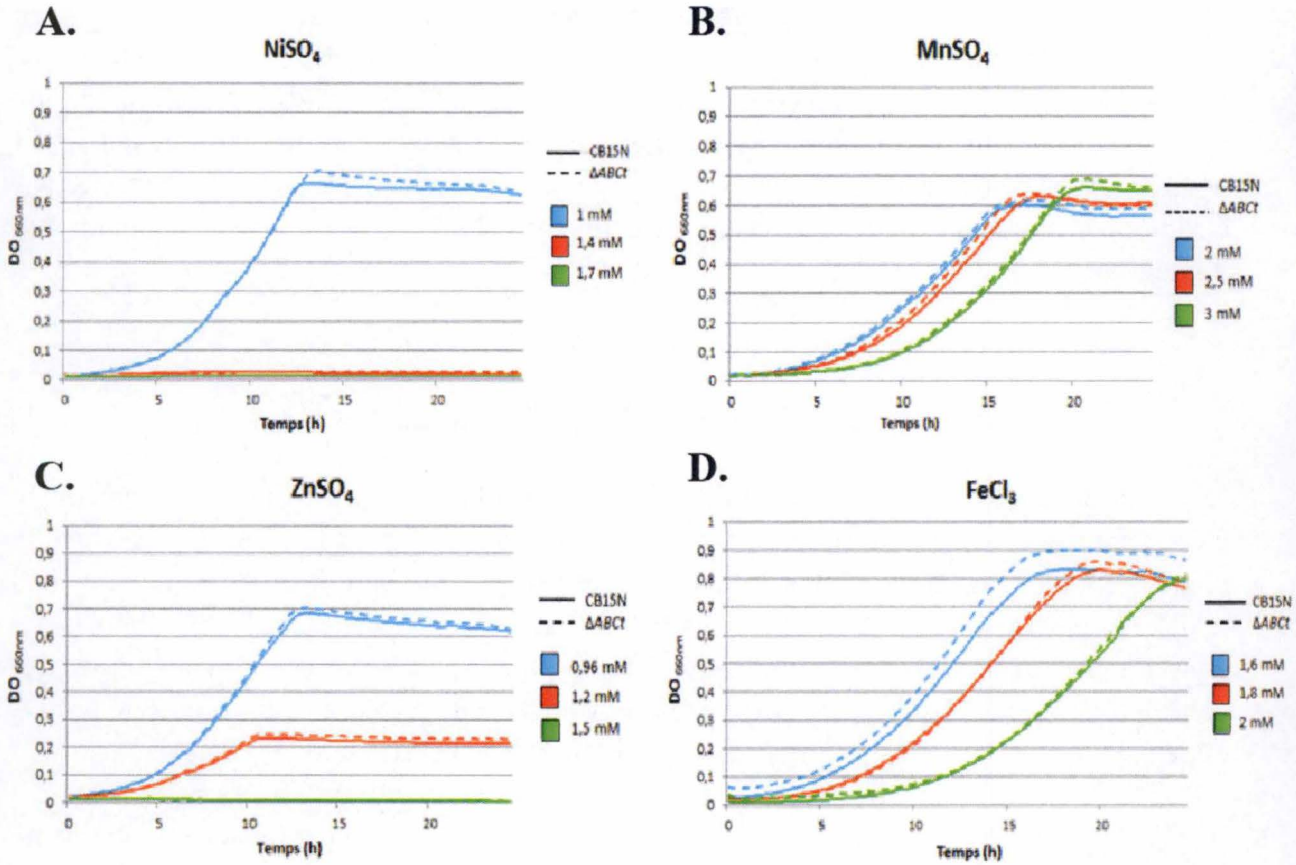


Figure 16 : Courbes de croissance de la souche sauvage (CB15N) et du délétant propre (Δ*ABCt*), traités avec différents métaux à différentes concentrations. (A) Traitement avec 1 mM ; 1,4 mM et 1,7 mM de $NiSO_4$; (B) Traitement avec 2 mM ; 2,5 mM et 3 mM de $MnSO_4$; (C) Traitement avec 0,96 mM ; 1,2 mM et 1,5 mM de $ZnSO_4$; (D) Traitement avec 1,6 mM ; 1,8 mM et 2 mM de $FeCl_3$.

E. Possibilité de coopération fonctionnelle entre le système PcoA/B et l'ABC transporteur perméase CC_2244

Afin d'en apprendre davantage sur le rôle potentiel de l'ABCt perméase dans la résistance au Cu chez *C. crescentus*, un délétant propre pour l'*ABCt* a aussi été créé génétiquement dans la souche délétante pour les gènes *pcoA* et *pcoB* (Δ*AB*). Cette souche mutante Δ*AB* présente une plus grande sensibilité au Cu en comparaison à la souche sauvage CB15N (Lawarée *et al.*, 2016). Durant sa thèse, Sébastien Gillet a montré que PcoA est une multicopper oxydase qui oxyde le Cu^{+} en une forme moins toxique Cu^{2+}. Il a aussi montré avec Emeline Lawarée que PcoB est localisée dans la membrane externe et pourrait fonctionner comme une pompe à efflux, expulsant le Cu vers le milieu extérieur. Ces deux protéines participent donc à la résistance au Cu de *C. crescentus*. Cependant des inconnues demeurent, notamment la façon dont le système PcoA/B est alimenté en Cu.

Une hypothèse serait que l'ABCt perméase travaille de concert avec ces deux protéines pour expulser le Cu hors de la cellule. Dans ce contexte, l'ABCt perméase (supposément ancrée en membrane interne) permettrait le transport du Cu du cytoplasme vers le périplasme et alimenterait ainsi le système PcoA/B. Ce système prendrait alors le relais pour oxyder le Cu^{+} en Cu^{2+} et expulser le Cu hors de la cellule (Fig. 17). D'après cette hypothèse, si un acteur de la voie est absent (PcoA/B ou ABCt), le phénotype observé devrait être le même que dans le cas où deux maillons manquent (PcoA/B et ABCt).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un double mutant propre Δ*AB*Δ*ABCt* et comparé sa sensibilité au Cu par rapport aux simples mutants Δ*AB* et Δ*ABCt* (Fig. 18). À 80 µM, le mutant Δ*ABCt* montre une plus forte sensibilité au Cu que le mutant Δ*AB*. Ceci suggère que l'ABCt perméase CC_2244 aurait un impact plus important dans la résistance au Cu de *C. crescentus* que le système PcoA/B. À cette concentration en Cu, le double mutant Δ*AB*Δ*ABCt* est 2 fois plus sensible que la souche Δ*ABCt* et environ 7 fois plus sensible que la souche Δ*AB*. La différence de sensibilité observée entre le double mutant et les simples suggère que l'ABCt perméase CC_2244 ne coopèrerait pas du tout avec le système PcoA/B pour faire face à un stress en Cu.

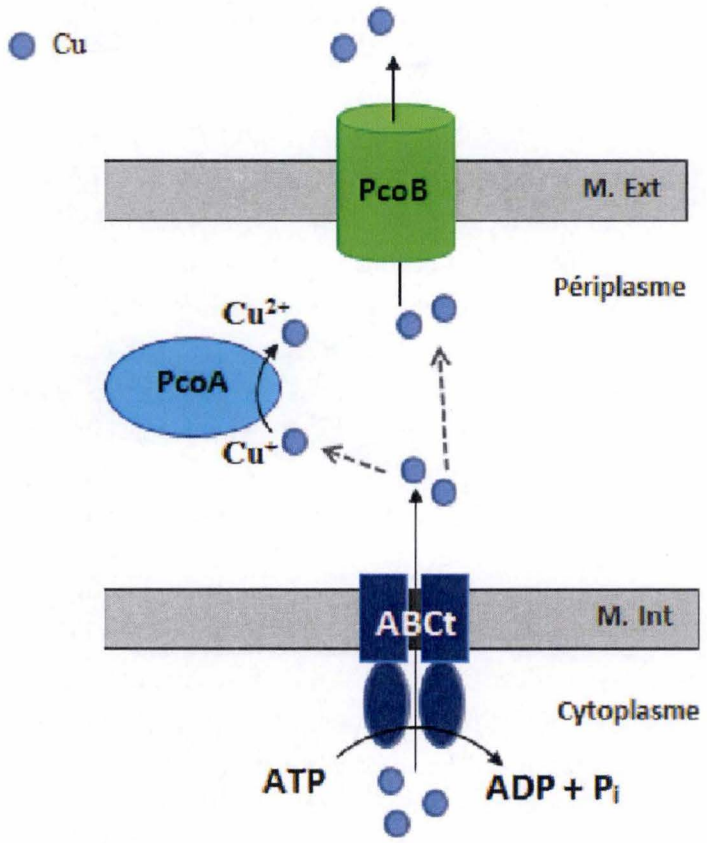


Figure 17 : Représentation schématique de l'hypothèse 1, selon laquelle l'ABCt perméase pourrait intervenir dans la voie d'export du Cu où sont impliquées les protéines du système PcoA/B, PcoA et PcoB.

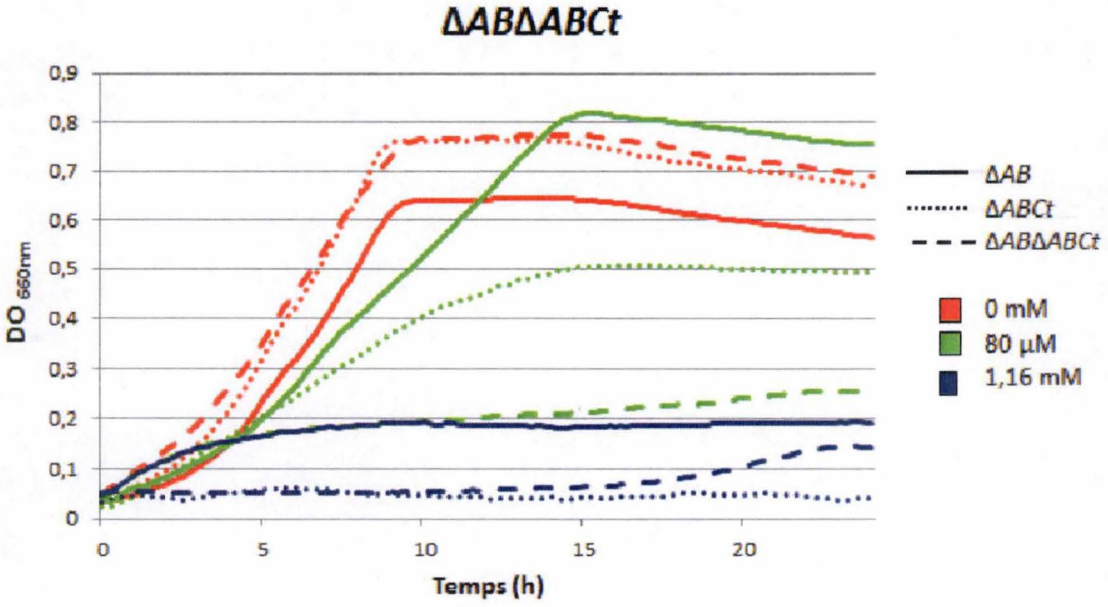


Figure 18 : Courbes de croissance des simples mutants Δ*AB* et Δ*ABCt* et du double mutant Δ*AB*Δ*ABCt* en condition contrôle (0 mM de Cu) et traitée avec 80 µM et 1,16 mM de Cu.

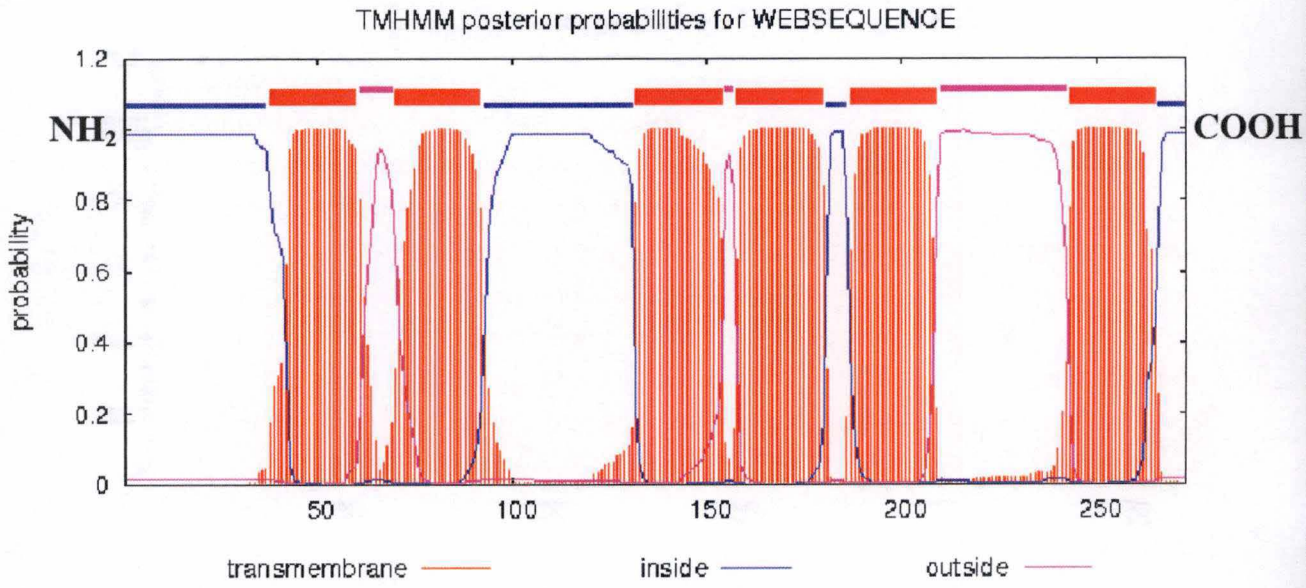
F. Localisation de l'ABC transporteur perméase

Nous avons également voulu étudier la localisation subcellulaire de notre protéine d'intérêt afin de vérifier si cette ABCt perméase est effectivement ancrée dans la membrane interne, tel qu'il est prédit. Dans ce but, un tag poly-histidine (6 histidines) a été fusionné à son côté N-terminal. D'après les prédictions bio-informatiques, les 2 extrémités N-terminale et C-terminale sont situées dans le cytoplasme. La littérature recommande de fusionner les tags du côté cytoplasmique plutôt que périplasmique. Dans notre cas les 2 extrémités répondaient à ce critère (Fig. 19), nous avons donc choisi l'extrémité N-terminale arbitrairement. Ce type de tag présente l'avantage d'être de petite taille (18 nucléotides), la probabilité qu'il altère le repliement ou la fonction de la protéine est donc limitée mais reste néanmoins présente. De plus, plusieurs expériences ont été réalisées sur des ABC transporteurs avec des tags histidine. Enfin, un tel tag permettrait par la suite de pouvoir purifier la protéine, notamment par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

Après avoir réalisé la construction génétique (cf. Matériels et Méthodes), la bonne intégration du vecteur contenant le tag a été vérifiée et confirmée par séquençage. Ensuite, afin de vérifier si notre fusion est stable et si notre protéine taguée est produite, nous avons réalisé un extrait protéique total et testé l'expression de l'ABCt perméase par Western-blot en utilisant des anticorps monoclonaux anti-polyhistidine. La protéine PcoA-His a été choisie comme contrôle positif et la souche sauvage CB15N sans tag his a été employée en tant que contrôle négatif. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas pu détecter la présence du contrôle positif, PcoA-His, ni celle de notre ABCt perméase taguée. Un tel résultat pourrait s'expliquer par le fait que notre anticorps primaire (anti-His) n'est plus fonctionnel.

Si nous parvenions à mettre en évidence la protéine taguée, il faudrait en premier lieu procéder à un fractionnement cellulaire. Ce protocole de centrifugation génère 2 fractions : une contenant le cytoplasme et la membrane interne, l'autre contenant le périplasme et la membrane externe. Cela permettrait de séparer les différentes fractions subcellulaires et ensuite de réaliser un immunoblot pour déterminer dans quelle fraction notre protéine est détectée.

A.



B.

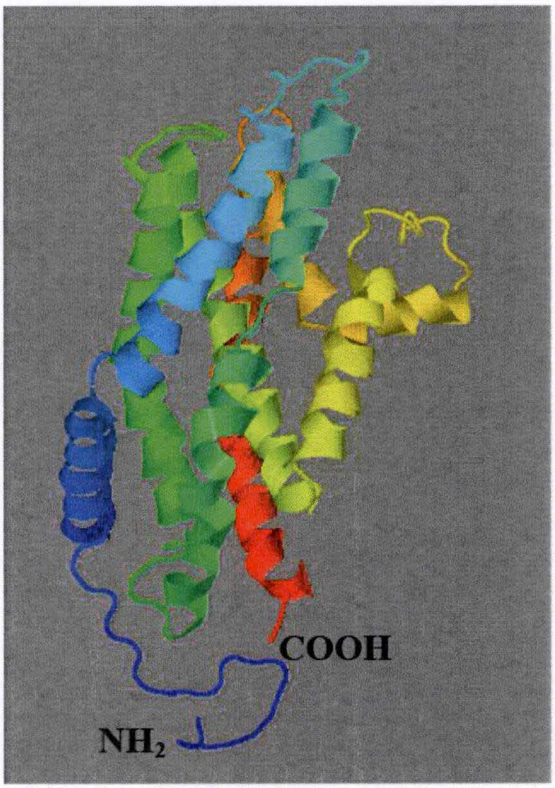


Figure 19 : (A) Prédiction de la localisation des domaines de la protéine CC_2244 de *C. crescentus* (TMHMM) ; (B) Représentation en 3D de l'ABCt perméase CC_2244 sur base de sa séquence protéique et de l'homologie avec des protéines déjà cristallographiées (Modeller).

Conclusions et Perspectives

A.

Sensibilité au Cu	
CB15N	+
Δ*AB*	++
Δ*ABCt*	+++
Δ*AB*Δ*ABCt*	++++

B.

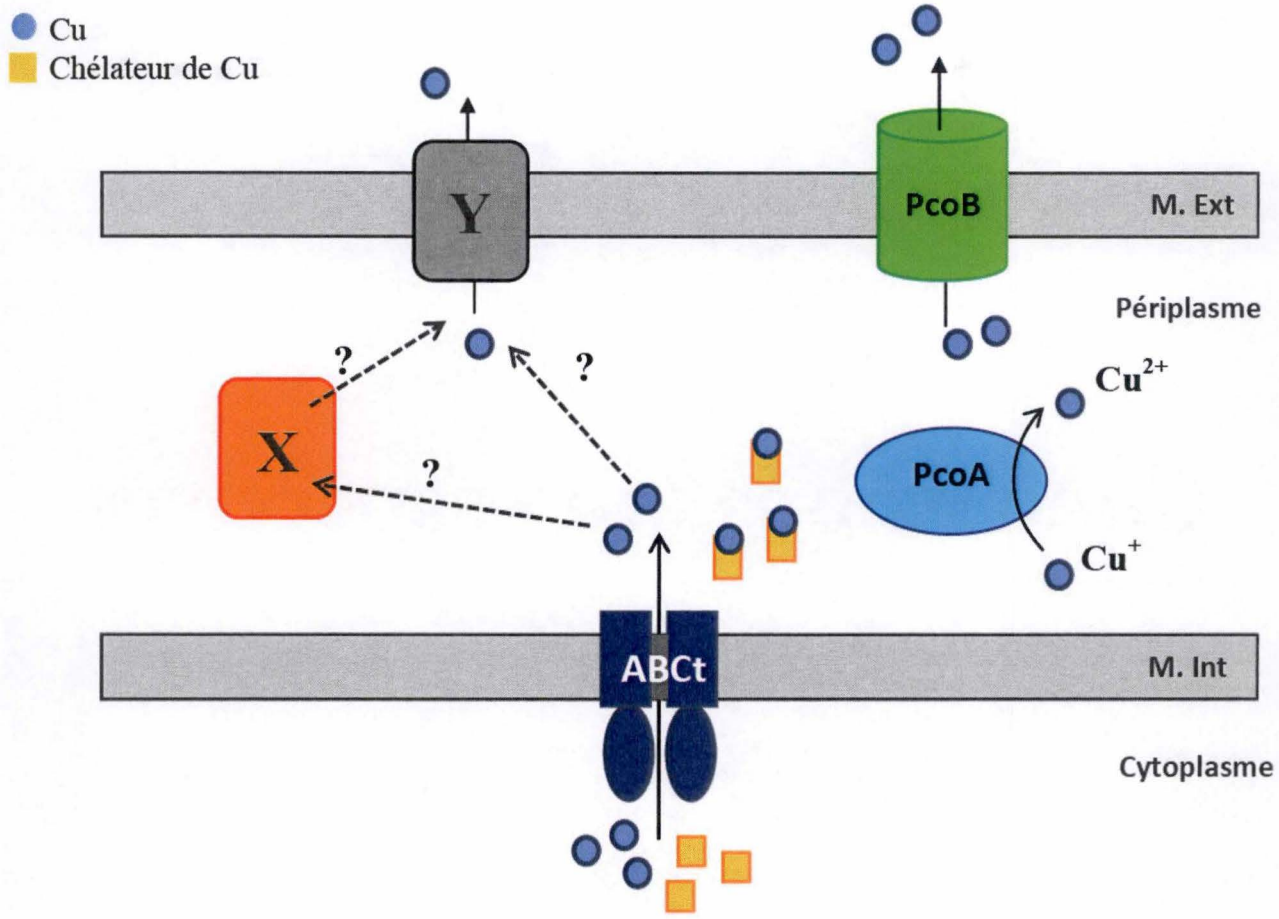


Figure 20 : (A) Sensibilité au Cu relative des différentes souches de *C. crescentus* (CB15N, Δ*AB*, Δ*ABCt*, et Δ*AB*Δ*ABCt*) ; (B) Représentation schématique de l'hypothèse (1) et de l'hypothèse (2). D'après l'hypothèse (1) l'ABCt perméase coopèrerait avec un système X et/ou un système Y pour résister à un stress en Cu. D'après l'hypothèse (2) l'ABCt perméase transporterait un autre composé que le Cu, par exemple un chélateur.

Conclusions et Perspectives

Les données collectées pendant ce mémoire montrent que l'ABCt perméase, CC_2244 possède une activité en lien avec la résistance au Cu chez *C. crescentus*. Ceci est appuyé par l'observation que dans des conditions de stress en Cu, la souche délétante pour le gène de l'*ABCt* (Δ*ABCt*) présente une plus grande sensibilité au Cu que la souche sauvage, CB15N de *C. crescentus*.

Des études précédemment menées dans le laboratoire ont mis en évidence l'implication du système PcoA/B de *C. crescentus* dans la résistance au Cu chez cette bactérie (Lawarée *et al.*, 2016). La première hypothèse que nous avons émise était que l'ABCt perméase, CC_2244 coopèrerait avec le système PcoA/B pour expulser le Cu hors de la cellule. Cependant, les premiers résultats obtenus sur base de la sensibilité au Cu des différents mutants (Δ*AB*, Δ*ABCt* et Δ*AB*Δ*ABCt*) nous mènent à penser que l'ABCt perméase ne coopèrerait pas avec PcoA/B. En effet, le double mutant (Δ*AB*Δ*ABCt*) est 2x plus sensible que le mutant Δ*ABCt* et environ 7x plus sensible que le mutant Δ*AB* lors d'un stress modéré en Cu. Si notre hypothèse était correcte, la sensibilité au Cu entre les simples et double mutants serait identique.

Nous avons dès lors émis une autre hypothèse selon laquelle l'ABCt perméase ne fonctionnerait pas avec le système PcoA/B mais plutôt avec un système X et/ou un système Y vers le(s)quel(s) il transporterait le Cu cytoplasmique (Fig. 20). Si on suit ce raisonnement, le double mutant Δ*AB*Δ*ABCt* serait donc privé des 2 voies de résistance au Cu, PcoA/B et ABCt-X/Y, expliquant dès lors sa sensibilité accrue au Cu.

On pourrait aussi envisager que l'ABC transporteur ne transporte pas du Cu mais un chélateur par exemple (Fig. 20). Une fois dans le périplasme, ce chélateur pourrait complexer le Cu libre, le rendant ainsi moins toxique pour la cellule. Dans ce cas, si l'ABCt perméase n'est pas présente (Δ*ABCt*), le chélateur serait incapable d'atteindre le périplasme, expliquant la sensibilité accrue au Cu de la souche Δ*ABCt*.

Une technique combinant le fractionnement cellulaire et la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) pourrait être utilisée pour infirmer cette dernière hypothèse. Les fractions cytoplasmique et périplasmique seraient séparées et la concentration en Cu dans chaque compartiment serait mesurée dans la souche sauvage et la souche Δ*ABCt*. Si une plus grande quantité de Cu était détectée dans la fraction cytoplasmique chez le mutant Δ*ABCt*, cela appuierait le fait que l'ABCt perméase soit impliquée dans le transport de Cu. À l'inverse, si aucune différence significative n'apparaissait entre les concentrations en Cu dans le cytoplasme et le périplasme, cela pourrait soutenir l'hypothèse que CC_2244 transporte un autre composé que le Cu vers le périplasme.

La localisation subcellulaire de l'ABCt perméase a également été envisagée dans ce mémoire. La plupart des études réalisées sur des ABC transporteurs rapportent qu'ils sont localisés dans la membrane interne. Afin de la localiser, nous avons fusionné un tag à notre protéine d'intérêt. Cependant rien n'a été détecté par immunoblot. Ces résultats nous mènent à penser que l'anticorps primaire pourrait être défectueux. Des réplicats supplémentaires avec un nouvel anticorps sont envisagés. Si le tag est détecté, il faudrait procéder à un fractionnement cellulaire afin de connaitre la localisation subcellulaire de l'ABCt perméase. Une alternative serait d'utiliser un autre type de tag, par exemple une GFP. On pourrait alors localiser notre protéine par microscopie à fluorescence.

Afin de déterminer la composition de l'ABC transporteur fonctionnel (2 perméases ou TMD + 2 NBD), une immunoprécipitation de l'His-ABCt perméase (à l'aide d'un anticorps anti-His) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des co-immunoprécipitats pourraient être réalisées. Parallèlement, la multimérisation de l'ABC transporteur pourrait être visualisée par immunoblot (à l'aide des anticorps anti-His) en conditions non dénaturantes à partir d'extraits protéiques natifs.

Il pourrait également être intéressant de mesurer l'expression génique de l'*ABCt* dans des conditions de stress en Cu. Cela pourrait nous renseigner sur la potentielle inductibilité de ce gène. Une première approche pourrait être de mesurer l'expression du gène au niveau transcriptionnel par qRT PCR. Ceci pourrait alors être éventuellement confirmé au niveau traductionnel par immunoblot.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Souches et plasmides

Les souches de *C. crescentus* ont été cultivées à 30°C dans de l'Hutner base-imidazole-buffered-glucose-glutamate (HIGG) avec une concentration modérée en phosphate (0,2 mM) et avec 5 µg/mL de kanamycine si nécessaire.

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C dans du Luria-Bertani (LB). De l'ampicilline (100 µg/ml) ou de la kanamycine (x µg/ml) ont été rajoutées si nécessaire.

Tableau 1 : **Souches**

Souches	Description	Références
CB15N	Souche sauvage de *C. crescentus*	Evinger *et al.*, 1977
Δ*AB*	Souche knock-out pour *pcoAB* obtenue par recombinaison homologue	Lawarée *et al.*, 2016
Tn *ABCt*	Mutant transpositionnel pour l'*ABC transporteur* obtenu par mutagenèse transpositionnelle	Cette étude
Δ*ABCt*	Souche knock-out pour l'*ABC transporteur* obtenue par recombinaison homologue	Cette étude
Δ*AB*Δ*ABCt*	Souche knock-out pour l'*ABC transporteur* dans la souche mutante Δ*pcoAB* obtenue par recombinaison homologue	Cette étude
Δ*ABCt*p*ABCt*	Souche knock-out pour l'*ABC transporteur* portant une copie du gène *ABC transporteur* sur le pMR10 sous le contrôle du promoteur *lac* ; KanR	Cette étude
Δ*AB*Δ*ABCt*p*ABCt*	Souche knock-out pour l'*ABC transporteur* dans la souche mutante Δ*pcoAB* portant une copie du gène *ABC transporteur* sur le pMR10 sous le contrôle du promoteur *lac* ; KanR	Cette étude
*ΔABCt*p*ABCt-his*	Souche knock-out pour l'*ABC transporteur* portant une copie du gène *ABC transporteur* tagué en N-terminal avec un tag His_6 sur le pMR10 sous le contrôle du promoteur *lac* ; KanR	Cette étude

Tableau 2 : Plasmides

Plasmides	Description	Références
pSK	Vecteur réplicatif à haut nombre de copies portant un gène de résistance à l'ampicilline, AmpR	
pNPTS138	Plasmide intégratif dans *C. crescentus* portant un gène de résistance à la kanmycine, KanR	Dickson, 1994
pMR10	Vecteur réplicatif à faible nombre de copies portant un gène de résistance à la kanamycine, KanR	Hall *et al.*, 1983

2. Milieux

Milieu défini, pauvre pour *C. crescentus* : HIGG (Hutner base-imidazole-buffered-glucose-glutamate)

HIGG

Volume	Composants
5 ml	Imidazole, 1 M, pH7
20 ml	Hutner base
15 ml	Glucose, 10%
7,5 ml	Acide glutamique, 20%
8,9 ml	NH_4Cl, 1 M
2 ml	Phosphate, 0,1 M
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	ddH_2O

Milieu riche pour *C. crescentus* : PYE (Peptone Yeast Extract)

PYE

Volume	Composants
2 g	Bacto-peptone
10 g	Yeast extract
2 ml	$MgSO_4$, 0,5 M
1 ml	$CaCl_2$, 0,5 M
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	dH_2O

Milieu riche pour *E. coli* : LB (Luria-Bertani)

LB

Volume	Composants
10 g	Bacto-peptone
5 g	Yeast extract
10 g	NaCl
15 g	Agar (si milieu solide)
1 l	dH_2O

3. Constructions de souches

a) Stratégie de construction des souches délétantes

À partir de l'ADN génomique de *C. crescentus*, les régions se trouvant en Amont et Aval (500 pb) de *l'ABC transporteur* ont été amplifiées par PCR en utilisant deux couples d'amorces (P1/P2 et P3/P4) (Fig. 21). Les produits PCR Amont et Aval ont ensuite été clonés séparément dans un plasmide à haut nombre de copies pSK, linéarisé en *EcoRV*. Chaque insert a ensuite été excisé de ce plasmide en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI/XbaI* ou *XbaI/BamHI* (pour la région Amont et la région Aval respectivement), ces sites de restriction sont présents dans les amorces. Les inserts Amont et Aval ont été assemblés dans un plasmide pNPTS138, incapable de se répliquer chez *C. crescentus,* et préalablement restreint en *EcoRI et BamHI*. Le produit de ligation a été transformé dans la souche DH10B d'*E.coli* (Fig. 21).

Un triparental mating a été réalisé entre la souche DH10B contenant le vecteur pNPTS-138-Amont-Aval de l'*ABC transporteur*, une souche Helper d'*E.coli* et (i) la souche sauvage CB15N ou (ii) la souche Δ*AB* de *C. crescentus*. Le vecteur pNPTS138 porte des gènes conférant une résistance à la kanamycine et une sensibilité au sucrose. Une première sélection a été réalisée sur un milieu PYE-Agar contenant de la kanamycine et de l'acide nalidixique. La kanamycine va permettre de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide ; quant à l'acide nalidixique, il est bactéricide pour *E.coli*, seul *C. crescentus* va y résister. Cette double pression de sélection va donc permettre de ne garder que les clones de *C. crescentus* ayant intégré le plasmide au niveau chromosomique par un premier évènement de recombinaison homologue (Fig. 21). Les clones isolés issus de cette conjugaison ont ensuite été striés sur du milieu PYE-Agar contenant de la kanamycine. Le lendemain, chaque clone a été cultivé dans du PYE liquide jusqu'à atteindre une DO_{660nm} de 0,4. Les cultures ont ensuite été diluées et striées sur des boites PYE-Agar contenant 3% de sucrose. En parallèle, ces mêmes cultures ont été striées sur des boites PYE-Agar contenant de la kanamycine.

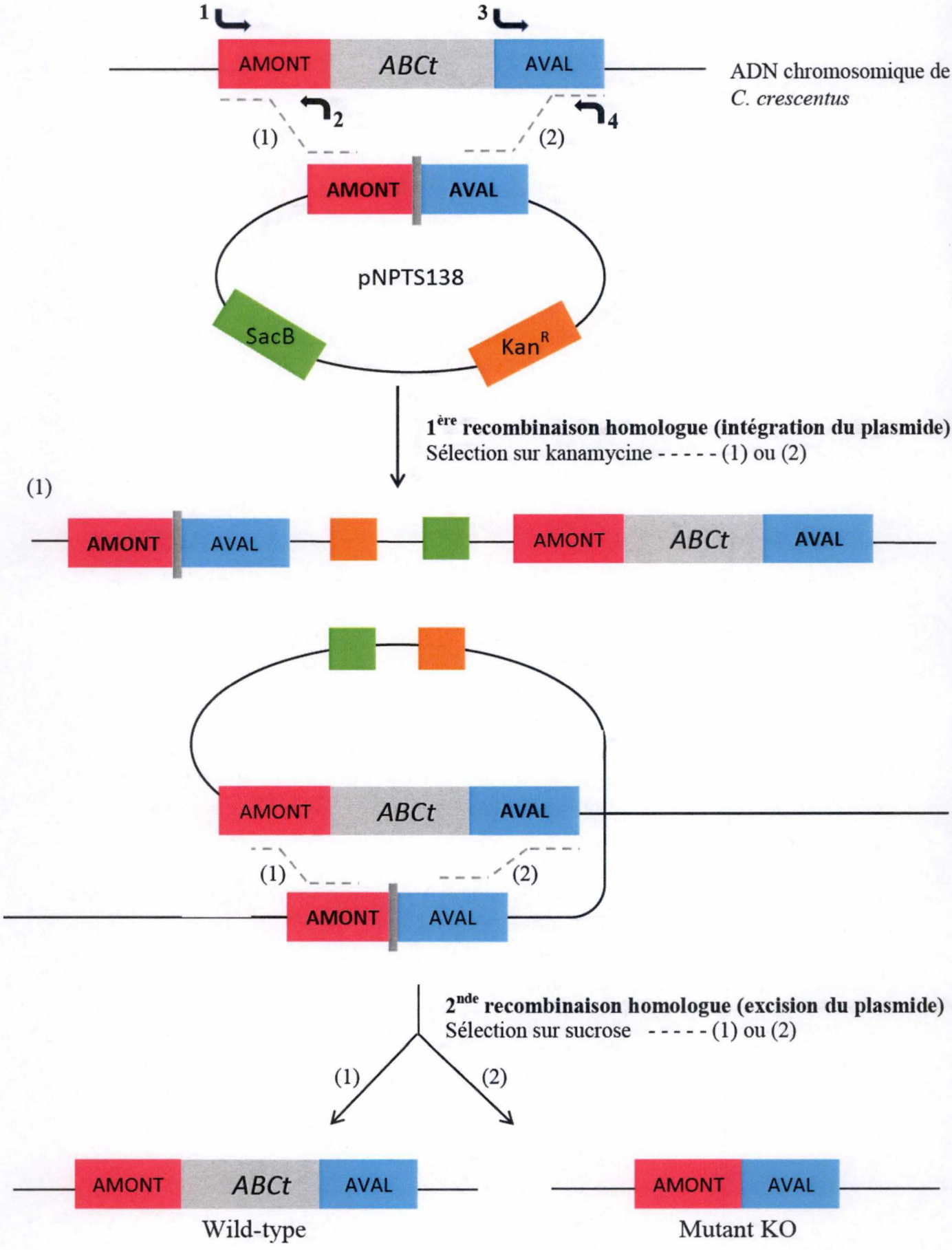


Figure 21 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour obtenir les souches délétantes pour l'*ABCt*, recombinaison homologue au locus, en 2 étapes.

Ce processus sélectionne les clones ayant subi le second événement de recombinaison homologue et ayant perdu le plasmide. Les clones qui poussent en présence de sucrose et pas en présence de kanamycine, sont ceux qui ont perdu la séquence KanR du pNPTS138. Selon les événements de recombinaison, cela résulte soit en un délétant propre (KO) pour l'*ABCt*, soit en un retour au génotype sauvage (wild-type) (Fig. 21). Un dernier contrôle a donc été réalisé par PCR afin de déterminer le génotype de chaque clone (hybridation de deux primers (P5 et P6) sur l'ADN chromosomique, 700 pb de chaque côté du gène *ABCt*).

b) Stratégie de construction des souches complémentées

La séquence génique de l'*ABC transporteur* a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de *C. crescentus* en utilisant un couple spécifique d'amorces (P9/P10 et P11/P12) (Tableau 3). Le produit PCR *his-ABCt* a ensuite été cloné dans un plasmide à haut nombre de copies, pSK, linéarisé par *EcoRV*. L'insert a ensuite été excisé de ce plasmide en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI et KpnI* et puis il a été cloné dans le plasmide réplicatif à faible nombre de copies pMR10 restreint avec *EcoRI et KpnI*. Le produit de ligation a été transformé dans la souche DH10B d'*E.coli*. Via un triparental mating, le plasmide en résultant a ensuite été introduit dans les souches de *C. crescentus* délétantes pour l'*ABC transporteur* (Δ*ABCt* et Δ*AB*Δ*ABCt*). Le génotype des clones contenant le pMR10-*ABCt a* été vérifié par PCR avec les amorces P7/P8, s'hybridant sur le plasmide de chaque côté de l'insert.

c) Stratégie de construction de la souche taguée avec un tag *his* en N-terminal

La séquence génique de l'*ABC transporteur* a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de *C. crescentus* en utilisant un couple spécifique d'amorces (P10/P13). L'amorce forward contenant les 6 histidines a été designé de façon à ce que la séquence commence par un codon start (ATG), permettant ainsi la traduction protéique. Le produit PCR a été cloné dans le plasmide réplicatif à faible nombre de copies, pMR10 restreint avec les enzymes *EcoRI* et *KpnI*. Cette construction a ensuite été transformée dans la souche compétente DH10B d'*E.coli*. Via un triparental mating entre la souche DH10B contenant le vecteur pMR10-*ABCt-his*, la souche Helper d'*E. coli* et la souche Δ*ABCt,* l'insert (pMR10-*ABCt*) a ensuite été introduit dans la souche de *C. crescentus* délétante pour l'*ABC transporteur* (Δ*ABCt*). Le vecteur pMR10 porte des gènes codant pour une résistance à la kanamycine. Les clones ayant intégré le plasmide seront sélectionnés sur base de cette résistance. Une PCR diagnostique a été réalisée afin de vérifier que ces clones possédaient bien le vecteur. Enfin, afin de s'assurer de la présence du tag his du coté N-terminal, nous avons séquencé ces clones.

4. Amorces utilisées pour la construction des souches

Tableau 3 : Amorces

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3' de l'amorce
P1	CGGAATTCGAGGGAGCCGCGCGGCCC
P2	GCTCTAGACGGCGGATCTCACGCTGG
P3	GCTCTAGACTCGATCGCGATCGGCGT
P4	CGGGATCCATCCGGTAGATATTGGAG
P5	TTGCACATGTGCGCGCCCAGGG
P6	TTGACCGCCGCGTAGGTGCGGC
P7	TCAATGATGACCTGGTGCAT
P8	CAAAAGGTCATCCACCGG
P9	GCTCTAGAATGAGAGACACGGCCGAGAGCG
P10	CGGAATTCTCAGCTCTTGAGACGGTAACCG
P11	CGGAATTCCCGACGTGGGGGCCTCGACCGG
P12	GCTCTAGATCAGCTCTTGAGACGGTAACCG
P13	ATGCATCATCATCATCATCACAGAGACACGGCCGAGAGCGTCATTCC

5. Détermination des courbes de croissance par Bioscreen

Les différentes souches de *C. crescentus* ont été cultivées la veille à 30°C sous agitation. Ensuite les cultures liquides (triplicats pour chaque condition) en phase exponentielle de croissance (DO_{660nm} de 0,4) ont été diluées dans de l'HIGG frais pour atteindre une $D.O_{660nm}$ finale de 0,05. Les bactéries ont ensuite été inoculées dans des plaques 96 puits. Enfin, les bactéries ont été mises en cultures à 30°C sous agitation constante avec différentes concentrations de $CuSO_4$ et avec de la kanamycine quand cela est nécessaire. Un spectrophotomètre Epoch nous a permis de mesurer la DO_{660nm} toutes les 10 min pendant 24 h.

6. Immunoblot

Les différentes souches sont inoculées la veille en précultures, puis diluées le lendemain à une DO_{660nm} de 0,05. Elles sont cultivées à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (DO_{660nm} de 0,4). Ensuite, 1,5 mL de chaque culture sont centrifugés 5 min à 13 000 rpm, le surnageant éliminé et le culot resuspendu dans 100 µL de SDS-PAGE loading buffer 1X. Ensuite les échantillons sont bouillis pendant 10 min à 99°C. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide à 12%. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avant le marquage par les anticorps. Les membranes sont bloquées au moins 30 min dans du PBS-Tween contenant 5% de lait en poudre. Elles sont ensuite incubées environ 2 h avec l'anticorps primaire (1/1000 anticorps anti-histidine) dans du PBST contenant 2% de lait. Les membranes sont alors lavées 3 fois pendant 5 min dans du PBS-Tween. Les membranes sont incubées 45 min avec l'anticorps secondaire (1/10 000 anticorps anti-souris) dans du PBST contenant 2% de lait. Les membranes sont lavées 3 fois pendant 5 min dans du PBST. Enfin ces membranes sont couvertes d'une solution ECL (Luminol et peroxyde) et révélées par un Image Quant Luminescent Image Analyzer 4000 (GE Healthcare).

7. Comptage de cellules par cytométrie de flux (FACS)

Les bactéries sont mises en culture la veille et diluées le lendemain à une DO_{660nm} de 0,05. Elles sont cultivées à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (DO_{660nm} de 0,4). Les cultures sont alors centrifugées pendant 5 min à 8000 rpm. Ensuite, elles sont fixées pendant 20 min dans du paraformaldéhyde à 2% à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du tampon de lavage (10 mM Tris pH 6,8 ; 100 µM EDTA). Enfin les cellules sont resuspendues dans du tampon de lavage. Les cellules sont ensuite diluées 100X (20 µL dans 2 mL) dans du PBS 1X filtré. Les échantillons sont ensuite conservés au frais et analysés par un cytomètre de flux BD FACSVerse. Les données générées sont analysées par un logiciel BD FACSuite V1.0.5.

Bibliographie

Bibliographie

Bovet, L., Kim, D., & Maeshima, M. (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant*, 207-218.

Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 1771-1776.

Chaturvedi, K., & Henderson, J. (2014). Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Frontiers in Cellular and Infection Micronbiology*.

Cotter, P. D., & & Hill, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 429-453.

Crichton, R., & Pierre, J. (2001). Old iron, young copper: from Mars to Venus. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine . 99-112.

Curtis, P., & Brun, Y. (2010, Mars). Getting in the Loop : Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 13-41.

Dassa, E., & Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 211-229.

Davidson, A., & Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 241-268.

Davidson, A., & Dassa, E. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 317-364.

Dawson, R., Hollenstein, K., & Locher, K. (2007). Uptake or extrusion : crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol*, 250-257.

Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, 1156-1166.

Doeven, M., & Biemans-Oldehinkel, E. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains.

Dupont, C., Grass, & G. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - new insights and applications. *Metallomics*, 1109-1118.

Errington. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 1-33.

Fath, M., & Kolter, R. (1993). ABC transporters : bacterial exporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 995-1017.

Franke, S., & Grass, G. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Bacteriol*, 3804-3812.

González, A., Shirokova, L., Pokrovsky, O., Emnova, E., Martínez, R., & Santana-Casiano, J. (2010). Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. *Colloid Interf Sci.*, 305-314.

Grass, G., & Rensing, C. (2001). Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Bacteriol*, 2145-2147.

Griffiths, E., & Williams, P. (1999). The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa. 87-212.

Harrison, F., & Bishop, D. (1984). Review of the impact of copper released into freshwater environments. *The Division*.

Higgins, C. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.*, 205-210.

Higgins, C., & Linton, K. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 918-926.

Holland, I., Cole, S., Kuchler, K., & Higgins, C. (2003). ABC Proteins : From Bacteria to Man. *Academic Press*.

Hollenstein, K., Dawson, R., & Locher, K. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural Biology* , 412-418.

Jones, P., & George, A. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 682-699.

Keyer, K., & Imlay, J. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *PNAS*, 13635-13640.

Kimura, T., & Nishioka, H. (1997). Intracellular generation of superoxide by copper sulfate in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 237-242.

Klein, J., & Lewinson, O. (2011). Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics*, 1098-1108.

Kojetin, D., Thompson, R., Benson, L., Naylor, S., & Waterman, J. (2005). Structural analysis of divalent metals binding to the *Bacillus subtilis* response regulator Spo0F : the possibility for in vitro metalloregulation in the initiation of sporulation . *BioMetals*, 449-466.

Komarek, M., Cadkova, E., & Chrastny, V. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides. *Environment International*, 138-151.

Lawarée, E., Gillet, S., Louis, G., Tilquin, F., LeBlastier, S., Cambier, P., et al. (2016). *Caulobacter crescentus* intrinsic dimorphism provides a prompt bimodal response to copper stress. *Nature Microbiology*.

Lee, S., Grass, G., Rensing, C., & Barrett, S. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 616-620.

Leggett, M., McDonnell, G., Denyer, S., Setlow, P., & Maillard, J. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance . *Journal of applied microbiology*, 485-498.

Linton, K., & Higgins, C. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol*, 5-13.

Locher, K. (2009). ABC transporters : structure and mechanism. *Phil. Trans. R. Soc*, 239-245.

Lu, G., Westbrooks, J., Davidson, A., & Chen, J. (2005). ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc Natl Acad Sci* , 17969-17974.

Lu, P., Liu, R., & Sharom, F. (2001). Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state. *Eur J Biochem* , 1687-1697.

Macomber, L., & Imlay, J. (2008). The iron sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *PNAS*, 8344-83449.

Mizan, M., Sadekuzzaman, M., Yang, S., & Ha, S. (2015). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms.

Nies, D., & Silver, S. (2007). Molecular Microbiology of Heavy Metals. *Springer Science & Business Media*.

Nikaido, H., & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 1-32.

Ortiz, D., Kreppel, L., Speiser, D., & McDonald, G. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo*, 3491–3499.

Osman, D., & Cavet, J. (2008). Copper Homeostasis in Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 217-247.

Outten, F., Huffman, D., & Hale, J. (2001). The independant cue and cus Systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Biological Chemistry*, 20670-30677.

Patzlaff, J., Van der Heide, T., & Poolman, B. (2003). The ATP/substrate stoichiometry of the ATPbinding cassette (ABC) transporter OpuA. *Biol Chem* , 29546-29551.

Pereira, B. (2007). La contamination diffuse des sols par les éléments traces métalliques en région walonne. *Faculté d'ingénierie agronomique, biologique et environnementale - UCL*.

Puig, S., & Thiele, D. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 171-180.

Reid, A., Pandey, R., Palyada, K., & Whitworth, L. (2008). Identification of *Campylobacter jejuni* genes contributing to acid adaptation by transcriptional profiling and genome-wide mutagenesis . *Applied and environmental microbiology*, 1598-1612.

Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *Microbiloogy Reviews*, 197-213.

Rukhman, V., Anati, R., & Adir, N. (2005). The MntC crystal structure suggests that import of Mn^{2+} in cyanobacteria is redox controlled. *Journal of Molecular Biology*, 961-969.

Saier, M. (2000). The transporter classification database: recent advances. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 354-411.

Smith, P., Karpowich, N., Millen, L., & Rosen, J. (2002). ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, 139-149.

Tatusov, R., Koonin, E., & Lipman, D. (1997). A Genomic Perspective on Protein Families. *Science*, 631-637.

Trevors, J., & Cotter, C. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*, 77-84.

Walker, J., Saraste, M., Runswick, M., & Gay, N. (1982). Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide fold. *Embo*, 945-951.

Young, J., & Holland, I. (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 177-200.

Young, S., & Setlow, P. (2004). Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *Appl. Microbiol.*, 1133-1142.