

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Caractérisation du rôle de PcoACC et PcoBCc dans l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus*

BARBIER , Clément

*Award date:*  
2014

*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.



# Université de Namur

Faculté des Sciences

**Caractérisation du rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus*.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de master en biochimie et en biologie moléculaire et cellulaire**

Clément BARBIER

Décembre 2013



**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>

## **Caractérisation du rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *Caulobacter crescentus***

BARBIER Clément

### Résumé

*Caulobacter crescentus*, une  $\alpha$ -protéobactérie aquatique, possède de nombreux systèmes de détoxification (notamment pour les métaux lourds) lui permettant de coloniser différents milieux contaminés.

L'objectif de ce mémoire est de comprendre les mécanismes moléculaires permettant à cette bactérie de maintenir une homéostasie intracellulaire du cuivre. Une analyse bioinformatique réalisée au cours du mémoire de S. Gillet a mis en évidence la présence de deux protéines PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> prédites pour jouer un rôle dans la réponse à un stress cuivré. La souche délétante pour les gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* montre une sensibilité accrue au cuivre.

L'objectif majeur de ce mémoire est caractériser indépendamment le rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et de PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*. La présence de deux codons *start* dans l'ORF de *pcoB<sub>Cc</sub>* interroge sur la taille réelle de la protéine PcoB<sub>Cc</sub> et a fait l'objet d'investigations.

Grâce à la technique de spectrométrie d'absorption atomique, nous avons pu mettre en évidence une perturbation de la concentration intracellulaire en cuivre dans la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>*. De plus, des souches délétantes pour les gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* ou *pcoB<sub>Cc</sub>* ont été créées et caractérisées. Elles présentent une sensibilité accrue à un stress cuivré par rapport à la souche sauvage CB15N. Toutes ces souches délétantes ont ensuite été complémentées avec un plasmide contenant les gènes d'intérêt. Ces expériences nous ont permis de mettre en avant le rôle de PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre et d'estimer sa taille à 32 kDa. En revanche, le rôle de PcoA<sub>Cc</sub> reste plus nébuleux.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

**Promoteur:** J.-Y. Matroule



## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement le professeur Jean-Yves Matroule, promoteur de ce mémoire, pour m'avoir confié ce travail. Je lui témoigne ma gratitude pour sa patience, son soutien et ses conseils qui m'ont été précieux au cours de cette année.

Je tiens également à remercier Emeline Lawarée, tutrice de ce mémoire, pour m'avoir transmis son savoir-faire, ses connaissances et surtout sa soif de résultats. Je remercie aussi toute l'équipe B.E.A.R : Jérôme pour sa bonne humeur permanente, Lionel pour son « soutien », Françoise pour sa gentillesse et Olivier pour sa joie de vivre.

J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe des mémorants pour leur soutien, surtout lors des dernières semaines du mémoire. L'ambiance au sein de l'équipe des mémorants m'a permis de souffler pendant les périodes stressantes de l'année.

D'avance, je remercie Florance Chainiaux, Jean-Jacques Letesson, Pierre Van Cutsem et Frederic Sylvestre pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Mes dernières pensées iront vers ma famille et Morgane qui ont toujours cru en moi pendant mes années d'études. Ce soutien m'a permis d'avancer dans les moments difficiles rencontrés pendant mon cursus scolaire.

Merci à tous et à toutes.



## Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction .....</b>   | <b>6</b>  |
| I. L'impact de l'environnement sur le vivant .....  | 7         |
| a. Adaptation .....   | 7         |
| b. L'homéostasie .....  | 7         |
| II. Importance des oligoéléments .....  | 8         |
| a. Terminologie d'éléments traces, de macro/microéléments et d'oligoéléments .....  | 8         |
| b. Exemples d'oligoéléments et leur régulation .....  | 9         |
| III. Le cuivre .....  | 9         |
| a. Propriétés physico-chimiques .....   | 9         |
| b. Source de cuivre .....   | 10        |
| c. Le cuivre, un élément à double tranchant.....  | 10        |
| d. Concentration de cuivre dans l'environnement.....  | 10        |
| IV. Homéostasie du cuivre .....   | 11        |
| a. Le système Cue.....  | 11        |
| b. Le système Cus .....   | 12        |
| c. Le système Pco .....   | 13        |
| d. Exemple de mécanismes régulateurs chez d'autres espèces bactériennes .....   | 13        |
| e. Le cuivre peut perturbation du cycle cellulaire chez certaines bactéries .....   | 14        |
| V. <i>Caulobacter crescentus</i> .....  | 14        |
| a. Cycle cellulaire .....   | 14        |
| b. Adaptation de <i>C. crescentus</i> face à un stress environnemental.....   | 15        |
| c. Homologies entre <i>E. coli</i> et <i>C. crescentus</i> .....  | 16        |
| VI. Objectif du mémoire .....   | 17        |
| <b>Résultats .....</b>  | <b>18</b> |
| I. La souche double délétante CB15N $\Delta$ pcoABCc montre une sensibilité accrue<br>au cuivre par rapport à la souche sauvage CB15N ..... | 19        |
| II. Stratégie utilisée pour la construction de souches délétantes et complémentées .....  | 20        |
| a. Création de souches délétantes .....   | 20        |
| b. Les souches délétantes montrent une sensibilité accrue au cuivre .....   | 21        |



|   |           |
|---|-----------|
| III. Construction et étude de la croissance des souches complémentées .....                               | 22        |
| a. Création de souches complémentées .....  | 22        |
| b. Etude de la croissance des différentes souches complémentées .....                                     | 22        |
| c. PcoA <sub>Cc</sub> et PcoB <sub>Cc</sub> semblent être spécifiques de l'homéostasie du cuivre .....    | 23        |
| d. Analyse comparative de l'accumulation de cuivre intracellulaire .....                                  | 24        |
| e. Analyse quantitative de la transcription de <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> et <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> ..... | 25        |
| <b>Discussion et perspectives .....</b>   | <b>27</b> |
| I. Rôle de PcoB <sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre .....  | 28        |
| II. Rôle de PcoA <sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre .....   | 29        |
| III. Perspectives afin de caractériser le rôle de PcoA <sub>Cc</sub> et PcoB <sub>Cc</sub> .....          | 30        |
| IV. Autres candidats potentiels pour l'homéostasie du cuivre .....  | 31        |
| <b>Matériel et méthode .....</b>  | <b>32</b> |
| I. Milieux .....  | 33        |
| II. Antibiotiques et sucres .....   | 34        |
| III. Souches bactériennes et techniques utilisées .....   | 35        |
| a. Souches bactériennes, conditions de croissance, des plasmides et des lignées cellulaires .....         | 35        |
| b. Polymerase Chain Reaction .....  | 35        |
| c. Purification de produits PCR .....   | 36        |
| d. Protocole de ligation .....  | 36        |
| e. Transformation des souches <i>E. coli</i> DH10B CaCl <sub>2</sub> -compétente .....                    | 36        |
| f. Extraction des plasmides .....   | 36        |
| g. Restriction enzymatique .....  | 37        |
| h. Conjugaison .....  | 37        |
| i. Bioscreen .....  | 37        |
| j. Western Blot .....   | 38        |
| k. Spectrométrie d'absorption atomique .....  | 39        |
| l. qRT-PCR .....  | 40        |
| 1. Extraction ADN/ARN .....   | 40        |
| 2. Traitement à la DNase .....  | 40        |
| 3. Rétro-transcription .....  | 40        |
| 4. PCR .....  | 40        |
| IV. Table des plasmides et des amorces .....  | 42        |
| <b>Références .....</b>   | <b>44</b> |



# **Introduction**



## **I. L'impact de l'environnement sur le vivant**

L'environnement se définit par l'ensemble des éléments biotiques et abiotiques qui le compose (1). La variabilité constante du milieu oblige les organismes à s'adapter pour survivre.

### **a. Adaptation**

L'impact de l'environnement sur les organismes vivants participe activement à leurs processus évolutifs (1). En effet, les modifications physiologiques et comportementales qui en découlent permettent d'expliquer une grande diversité au sein des différentes espèces. Les adaptations sont variables selon les espèces et permettent à certaines d'entre elles de pouvoir coloniser des milieux hostiles. Par exemple, suite à une succession d'adaptations, *Bacillus aeolius* est capable de vivre à plus de 2700 mètres de profondeur, à proximité de points chauds et où la concentration en sel est très importante. Ce genre d'environnement serait hostile pour la plupart des bactéries telles qu'*Escherichia coli* ou *Caulobacter crescentus* (2).

Dans la nature, les organismes luttent constamment face à un environnement variable. La notion de « stochasticité environnementale » définit le caractère imprévisible de l'environnement dont la composition peut changer en fonction du temps et de l'espace (1). Par exemple, la température, la salinité de l'eau, la disponibilité en lumière, en nutriments ou encore en oxygène sont des variables pouvant influencer la composition d'un environnement. Afin de survivre à ces variations, tout organisme vivant possède une « valence écologique » lui permettant de tolérer de faibles modifications de certains paramètres de l'environnement. Cependant, de brusques changements environnementaux peuvent induire un stress important chez l'organisme. Pour survivre, ce dernier n'a alors que deux options : (i) s'adapter en mettant en place des systèmes de régulation ou (ii) fuir afin d'atteindre un milieu plus favorable (1).

### **b. L'homéostasie**

L'homéostasie représente la capacité d'un système à conserver son équilibre (pH, température, salinité, ...) en dépit de toute contrainte externe. Cet équilibre est assuré par des mécanismes homéostatiques essentiels à la survie des organismes.

Par exemple, les organismes ont développés des systèmes permettant de réguler leur température intracellulaire afin d'éviter l'inactivation des protéines. Le taux transcriptionnel des chaperonnes HSP (pour *Heat Shock Protein*) illustre bien l'adaptation des bactéries face à un stress thermique. Une augmentation thermique du milieu induit une surexpression des HSPs permettant ainsi la protection, la régulation et la stabilité des protéines néoformées auxquelles elles sont associées (3).

| Eléments majeurs |       | Eléments traces |           |
|------------------|-------|-----------------|-----------|
| Oxygène          | 46,6% | Fluor           | 0,07%     |
| Silicium         | 27,7% | Chlore          | 0,002%    |
| Aluminium        | 8,1%  | Chrome          | 0,02%     |
| Fer              | 5,0%  | Vanadium        | 0,01%     |
| Calcium          | 3,63% | Nickel          | 0,008%    |
| Sodium           | 2,80% | Zinc            | 0,0065%   |
| Potassium        | 2,50% | Azote           | 0,0046%   |
| Magnésium        | 2,00% | Cuivre          | 0,0045%   |
| Hydrogène        | 0,14% | Cobalt          | 0,0023%   |
| Titane           | 0,44% | Plomb           | 0,0015%   |
| Phosphore        | 0,11% | Bore            | 0,0003%   |
| Manganèse        | 0,10% | Molybdène       | 0,0001%   |
|                  |       | Iode            | 0,00003%  |
|                  |       | Cadmium         | 0,00002%  |
|                  |       | Sélénium        | 0,000009% |

**Tableau 1. Eléments constituant la croûte terrestre.** Les 12 éléments majeurs représentent 99,4 % de la masse totale. Les 15 éléments traces représentent quant à eux 0,6 % de la masse totale de la croûte terrestre.

La régulation du pH par des pompes à proton est un autre exemple de mécanisme homéostatique. Ces pompes, en hydrolysant une molécule d'ATP, transportent des protons contre leur gradient de concentration permettant la régulation du pH. Ainsi, lors d'une acidification du milieu extérieur, ces pompes permettent à la bactérie de maintenir son homéostasie intracellulaire stable (4).

D'une manière générale, les mécanismes homéostatiques sont nombreux et permettent aux organismes de moduler et de coordonner les activités de leurs différents métabolismes en les adaptant aux fluctuations de l'environnement et à leurs propres besoins.

## **II. Importance des oligoéléments**

### **a. Terminologie d'éléments traces, de macro/microéléments et d'oligoéléments**

La notion « d'éléments traces » (Cd, Cu, Zn, Pb, Cl,..) regroupe 68 minéraux composant la croûte terrestre et dont la concentration est inférieure à 0,1 %. L'ensemble des éléments traces ne représente que 0,6 % de la croûte terrestre, par opposition aux 12 éléments majeurs (O, Si, Fe, Al, Ca,..) qui représentent 99,4 % (Tab. 1) (5) (6).

Il existe deux catégories d'éléments traces : les macros et les microéléments. Afin de distinguer ces deux groupes, le seuil de partage est fixé à 0,01 % de la masse sèche totale d'un organisme (5) (6).

Parmi les microéléments, on retrouve la classe des «oligoéléments ». A faible concentration, ces derniers sont indispensables à de nombreux processus biologiques. Cependant, la plupart des oligo-éléments s'avèrent toxiques quand leur biodisponibilité dépasse un seuil critique. Cette dualité explique la mise en place de mécanismes complexes régulant l'homéostasie intracellulaire des différents oligo-éléments (assimilation et détoxification) au cours de l'évolution (5) (7).



## **b. Exemples d'oligoéléments et leur régulation**

Le calcium est essentiel à l'activation de la calmoduline par changement de conformation. Une fois activée, cette enzyme catalyse la production de l'AMP<sub>c</sub>, un messager secondaire intervenant dans de nombreuses voies de signalisation en phosphorylant une Protéine Kinase A (PKZA). Cependant, une hypercalcémie, qualifiant un taux important de calcium dans le sang, peut entraîner chez l'homme des perturbations physiologiques telles que : la tétanie musculaire, la faiblesse musculaire, l'asthénie ou encore l'anorexie (8).

Le zinc est un cofacteur pour plus de 200 métalloenzymes. Cet oligoélément active également l'expression de certaines protéines comme la métallothionéine. Cette entité biologique possède une haute affinité pour les ions métalliques et contribue à la détoxification des cellules (9). De plus, le zinc joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire en influençant la production d'interleukine-4 et d'interleukine-6 (8) (9). Une faible carence en zinc diminue fortement le système immunitaire mais perturbe aussi la division cellulaire, la croissance tissulaire ou encore la réponse cellulaire face à un stress oxydatif. Cependant, une trop grande quantité de zinc dans l'organisme peut engendrer des perturbations physiologiques comme une forte diminution du taux de cuivre ou une réduction des fonctions immunitaires (10). Le zinc nécessite donc d'être finement régulé par l'organisme pour éviter toute perturbation physiologique.

## **III. Le cuivre**

### **a. Propriété physico chimique**

Le cuivre est un élément chimique représenté par le symbole Cu. Grâce à ses particularités physiques, ce métal est notablement utilisé en métallurgie afin de former de nombreux alliages (bronze, laiton, ...) (11). Dans la nature, le cuivre existe sous deux formes ioniques distinctes : une forme réduite Cu<sup>+</sup> et une forme oxydée Cu<sup>2+</sup>. La forme oxydée est soluble dans l'eau et est couramment utilisée comme agent bactériostatique et fongicide. L'oxydation de la forme réduite se fait au contact de l'oxygène atmosphérique (12).



## **b. Source de cuivre**

Le cuivre se trouve naturellement sous forme de sulfures ( $\text{CuS}$  et  $\text{Cu}_2\text{S}$ ) ou d'oxyde ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) (11). On le retrouve naturellement dans les sédiments, les roches, ... La biodisponibilité du cuivre et ses caractéristiques physiques (malléable, conducteur thermique et chimique) expliquent pourquoi ce métal fut le premier à être travaillé par l'Homme ( $V^{\text{ème}}$  millénaire avant J.C). Aujourd'hui, il est largement utilisé dans l'agriculture en tant qu'antifongique et antimicrobien, dans l'industrie ou encore dans le bâtiment. La production mondiale de cuivre est de 16,2 millions de tonnes par an. Cette production est essentiellement assurée par les pays d'Amérique du Sud (7).

L'utilisation massive du cuivre depuis plus de 7000 ans représente une source de pollution importante de l'environnement. Le milieu environnemental le plus contaminé est le sol, principalement dû aux scories d'extraction et de broyage des minerais. Mais les boues provenant des eaux usées, les déchets non recyclés de l'industrie métallurgique et des installations électriques sont aussi des sources de pollution non négligeables. Dans les eaux, le cuivre provient principalement de l'érosion du sol par les cours d'eaux. Dans l'air, la principale source de pollution est la poussière entraînée par les vents et la combustion de combustibles fossiles. Ces pollutions viennent s'ajouter aux «sources de pollutions naturelles» telles que : les éruptions volcaniques, la décomposition végétale et les feux de forêts (11) (13).

Cette accumulation de cuivre perturbe fortement l'activité biologique des sols. Elle influence de manière négative l'activité des micro-organismes et ralentit le recyclage de la matière organique. Indirectement, les terres agricoles et les élevages sont impactés par cette pollution (7) (13).

## **c. Concentration de cuivre dans l'environnement**

La concentration en cuivre varie en fonction des milieux environnementaux. Dans l'océan, la concentration en cuivre varie entre 0,6 et 400  $\mu\text{g/l}$ . En revanche, dans les rivières, la concentration en cuivre peut atteindre 700  $\mu\text{g/l}$ . Cette variabilité peut être expliquée par la nature du terrain, certaines eaux étant passées par infiltration dans des sols contenant un taux de cuivre élevé (sédiments, roches,...). Dans les sols, la concentration en cuivre varie entre 10 et 40  $\text{mg/kg}$ . Dans les sédiments, la teneur en cuivre peut atteindre quelques  $\text{g/kg}$ . (6)

## **d. Le cuivre, un élément à double tranchant**

Le relargage de l'oxygène dans l'atmosphère il y a 3 milliards d'années a permis l'oxydation de la forme insoluble  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , la forme soluble. De par le potentiel rédox élevé du couple  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ , le cuivre s'avère être un cofacteur idéal pour différents processus biologiques.



La superoxyde dismutase ou la cytochrome dismutase sont des enzymes périplasmiques cuivre dépendantes et illustrent bien l'importance du cuivre pour les organismes (14).

Par conséquent, cet oligo-élément est essentiel pour certains processus cellulaires vitaux comme le transport d'ions, la pigmentation, la coagulation sanguine ou encore la respiration cellulaire(15). De plus, chez l'homme, une carence en cuivre est souvent associée à un état pathologique comme l'anémie ou l'ostéoporose (12).

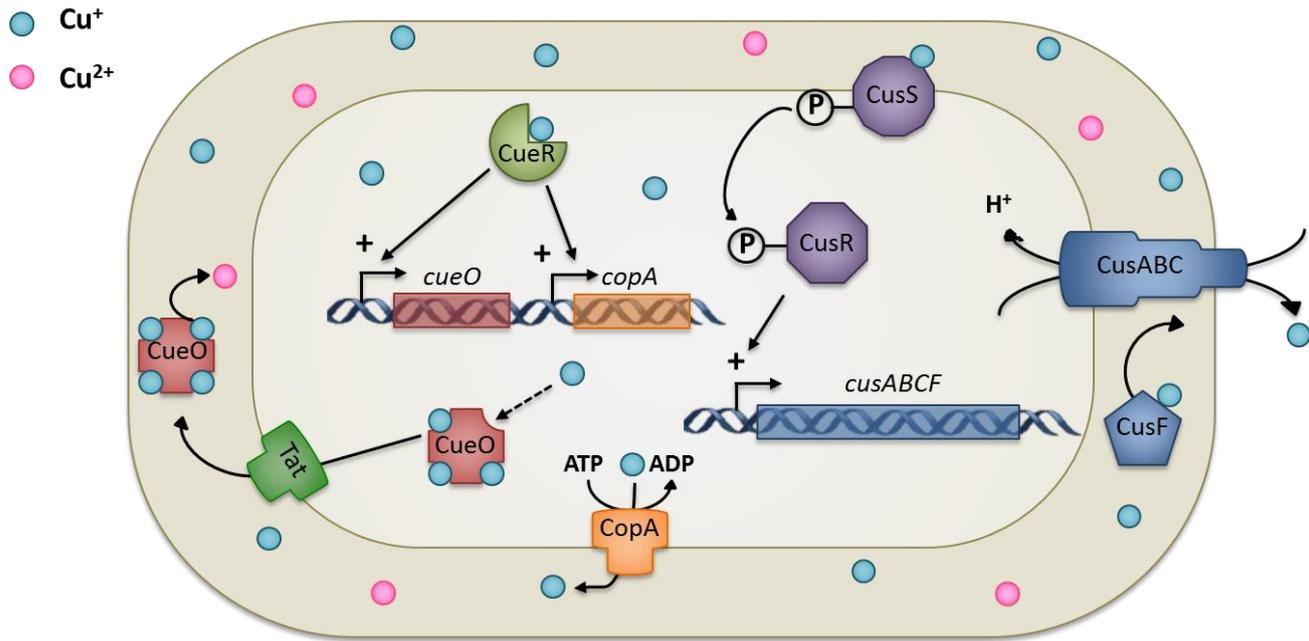
Cependant, à haute concentration, le cuivre est toxique. En effet, la forme réduite  $\text{Cu}^+$  peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène, catalysant une réaction de type Fenton [ $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ]. Les radicaux libres issus de cette réaction pourront, à leur tour, oxyder différents substrats cellulaires tels que des protéines, de l'ADN ou encore des lipides, entraînant éventuellement la mort cellulaire. De plus, le cuivre peut également s'avérer toxique en déplaçant certains ions natifs métalliques nécessaires au bon repliement de métalloprotéines, de lipolysaccharides, d'acides nucléiques inhibant ainsi leur fonction (14).

#### **IV. Homéostasie du cuivre**

La dualité du cuivre nécessite une régulation fine de son homéostasie intracellulaire afin de maintenir le bon fonctionnement des activités cellulaires tout en évitant les effets cytotoxiques. L'étude des systèmes de régulation de l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *E. coli* a permis de mettre en évidence l'existence de deux systèmes majeurs : les systèmes Cue et Cus (Fig. 1). Le système Cus confère une tolérance supplémentaire au cuivre dans des conditions de stress extrême alors que le système Cue est le principal système dans l'homéostasie du cuivre (14). Certaines souches d'*E. coli* hébergent en plus un système plasmidique Pco. Ce système implique 7 gènes (*pcoABCDRSE*) fournissant une résistance au cuivre supplémentaire (16).

##### **a. Le système Cue**

Le système Cue (pour *Cu export*) est le principal système impliqué dans l'homéostasie du cuivre (16). La présence d'un atome de  $\text{Cu}^+$  dans le cytoplasme suffit à induire l'expression des gènes *cueO* et *copA* via la protéine CueR. Cette protéine est un senseur cytoplasmique de  $\text{Cu}^+$  extrêmement sensible (détection d'un atome par cytoplasme !). CueR est aussi un facteur de transcription appartenant à la famille MerR (metal-responsive transcriptional regulator).



**Figure 1. Homéostasie du cuivre chez *E. coli*.** Deux systèmes sont principalement impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez *E. coli*. Le premier est le système Cue et est le principal acteur régulant la concentration en cuivre intracellulaire, en éjectant le  $\text{Cu}^+$  du cytoplasme vers le périplasme. Lorsque la concentration en cuivre devient trop importante, il y a activation d'un deuxième système. Le système Cus transporte le cuivre directement du cytoplasme/périplasme vers le milieu extracellulaire.

La région promotrice en amont de *cueO* et *copA* présente une caractéristique commune à tous les gènes sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille MerR : les régions -10 et -35 sont espacées de 19 paires de bases (pb) au lieu de 17 (17).

En présence ou en absence de l'ARN polymérase ou avec ou sans cuivre, CueR lie spontanément le promoteur. Mais c'est seulement en présence de cuivre que CueR induit un changement conformationnel au niveau du promoteur permettant la formation d'un complexe initiateur et ainsi la transcription de *cueO* et *copA* (17). CueO est une multi-copper oxydase pouvant lier quatre atomes de  $\text{Cu}^+$  dans le cytoplasme. Grâce à la présence d'un peptide signal TAT (motif Twin-Arginine), cette protéine liée à 4 atomes de cuivre peut atteindre le périplasma via la voie TAT (*Twin Arginine translocation*). Cette voie permet la translocation, du cytoplasme vers le périplasma, de protéines repliées possédant un motif Twin-Arginine. Une fois dans le périplasma, les quatre atomes de  $\text{Cu}^+$  sont oxydés en  $\text{Cu}^{2+}$  (18). La forme oxydée étant nettement moins toxique que la forme réduite, CueO protège ainsi les métallo-enzymes cuivre-dépendantes localisées dans le périplasma de la toxicité de  $\text{Cu}^+$  (Fig. 1).

CopA est une ATPase de type P. Cette famille d'ATPase permet le maintien d'un potentiel électrochimique d'une membrane en transportant des ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) contre leur gradient électrochimique au cours d'un cycle où une molécule d'ATP est hydrolysée. Chez *E.coli*, CopA exporte le cuivre sous sa forme réduite  $\text{Cu}^+$  du cytoplasme vers le périplasma, que ce soit en condition aérobie ou anaérobie (Fig. 1). Une souche délétée pour le gène *copA* montre une hypersensibilité au cuivre. Cependant, la tolérance aux autres métaux (zinc, cadmium, argent, plomb) reste inchangée (19).

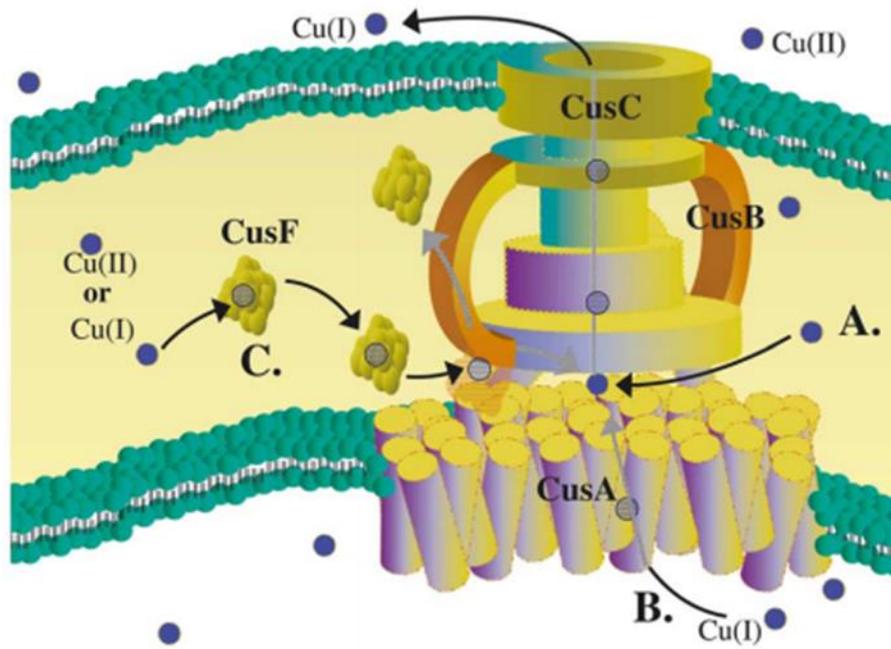
## b. Le système Cus

En condition aérobie, lorsque la concentration intracellulaire en cuivre dépasse 100  $\mu\text{M}$ , un deuxième système est activé : le système Cus (pour *Cu sensing*). Les gènes codant pour les protéines impliquées dans ce mécanisme sont agencées en opéron (*cusCFBA*).

Lorsque la concentration intracellulaire en cuivre augmente, l'expression de l'opéron est induite via un système sensoriel à deux composants CusRS. CusS est une protéine membranaire possédant une région périplasmique capable de lier le  $\text{Cu}^+$ . Associée au cuivre, cette protéine s'autophosphoryle. CusS phosphorylé peut ensuite activer CusR par phosphorylation (16). Une fois produites, les protéines CusA, CusB et CusC forment un canal traversant les deux membranes (Fig. 2). Le transporteur multi-protéique CusABC permet ainsi le transport des ions  $\text{Cu}^+$  du cytoplasme vers le milieu extracellulaire.

CusF est une petite protéine périplasmique (10 kDa) capable de lier les ions  $\text{Cu}^{+2}$  localisés dans le périplasma, permettant l'éjection du cuivre du périplasma vers le milieu extracellulaire en utilisant le canal CusABC.

Il a été montré chez *E. coli* que le système Cus joue un rôle prépondérant en condition anaérobie (20). En effet, en condition anaérobie le seuil d'activation du système Cus est estimé à une concentration en cuivre intracellulaire de seulement 60  $\mu\text{M}$ . En absence d'oxygène, une perte d'efficacité du système Cue a aussi été démontrée (14).



**Figure 2.** Schéma représentant le système Cus. CusA joue le rôle de pompe au niveau de la membrane interne. CusB, la protéine périplasmique, et CusC, la protéine ancrée dans la membrane externe, forment un canal à travers le périplasm. L'entrée du cuivre se fait au niveau du périplasm (A.) par l'intermédiaire de CusF ou au niveau du cytoplasme (B.) (14).

Outre le cuivre, le système Cus participe également à la régulation de l'argent chez *E. coli* (20).

### c. Le système Pco

Le système Pco comprend 7 gènes (*pcoABCDRSE*) agencés en opéron sur un plasmide et confère une résistance au cuivre supplémentaire. Ce système découvert chez *E. coli* n'est pas présent chez toutes les espèces et reste encore très peu compris.

Les gènes *pcoRS* codent pour un système sensoriel à deux composants. PcoS joue le rôle de senseur de cuivre et possède deux domaines transmembranaires reliés par une boucle périplasmique. En réponse à une concentration excessive en cuivre, PcoS active le facteur de transcription PcoR (via un transfert de phosphate) induisant l'expression de l'opéron *pcoABCD* (21).

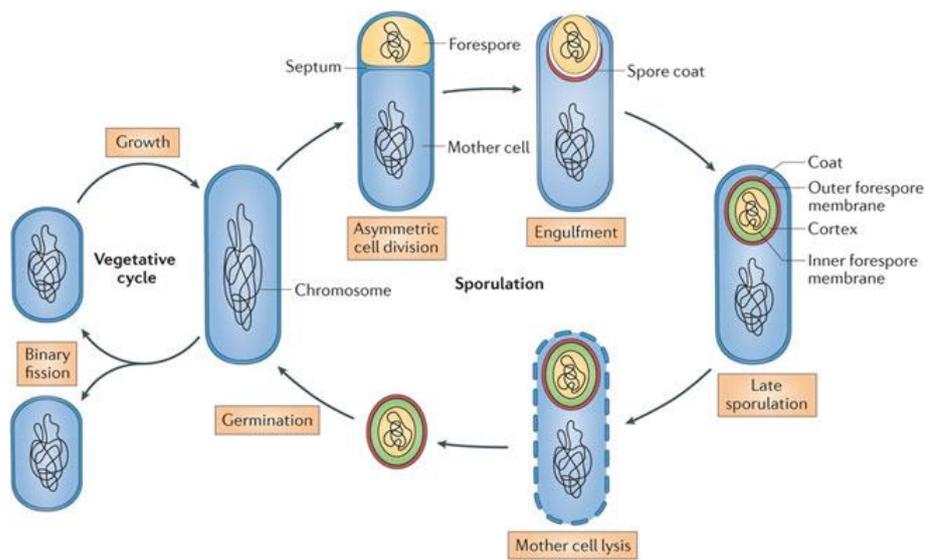
*pcoABCD* sont des gènes sous le contrôle d'un promoteur inductible par le cuivre (*copper-inducible promotor*) : *PpcoA*. PcoA, PcoC et PcoD sont des protéines périplasmiques alors que PcoB est ancrée en membrane externe (21) (Fig. 2). Ces quatre protéines participent à l'expulsion d'ions  $\text{Cu}^+$  vers le milieu extracellulaire.

Le gène *pcoE* possède son propre promoteur *PpcoE* et code pour une protéine périplasmique PcoE. Cette protéine n'est pas indispensable pour la résistance au cuivre. Cependant, chez *E. coli*, elle joue un rôle dans le recouvrement d'un état normal après un stress induit par le cuivre (21).

### d. Exemple de mécanismes régulateurs chez d'autres espèces bactériennes

Chez *Pseudomonas syringea*, une gamma-protéobactérie, des systèmes de détoxification sont comparables à ceux présents chez *E. coli*. Les protéines homéostatiques sont encodées par l'opéron *copABCDRS*, semblable au système plasmidique *pcoABCD*. En effet, l'opéron *copABCD* code pour des protéines périplasmiques (CopA, CopC et CopD) et une protéine membranaire (CopB). Le système sensoriel à deux composants CopRS est homologue à celui porté par l'opéron *pcoABCDRSE*. Cependant, il n'y a toujours pas d'homologue de PcoE identifié chez *P. syringea* (21).

*Salmonella typhimurium*, une entérobactérie à gram négatif, possède deux régulateurs de réponse appartenant à la famille des facteurs de transcription MerR : CueR et GolS. En réponse à une concentration importante en cuivre, CueR induit l'expression de CopA, une P-ATPase, et de CuiD, une *multicopper oxydase*. GolS active l'expression de GolT, une P-ATPase, et GolB, une CopZ/Atx1-like protein. Cette protéine délivre les ions  $\text{Cu}^+$  aux P-ATPases afin d'expulser le  $\text{Cu}^+$  du cytoplasme (22).



Nature Reviews | Microbiology

**Figure 3.** Cycle cellulaire de *Bacillus subtilis*. A gauche, le cycle végétatif, par fission binaire. A droite, le cycle de sporulation. Une division asymétrique entraîne la formation d'une préspore à l'un des pôles qui passera par un stade d'enkystement, un « coating » et une maturation avant sa dissémination dans l'environnement (24).

#### e. Le cuivre peut perturbation du cycle cellulaire chez certaines bactéries.

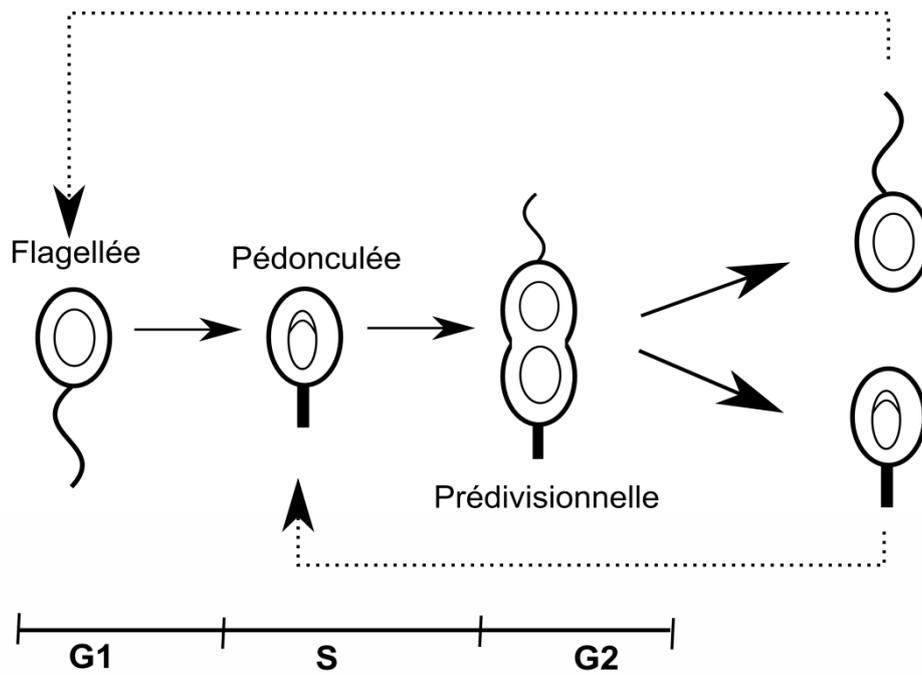
Chez certains organismes procaryotes, le cuivre peut induire des perturbations lors du développement et de la division cellulaire.

Chez *Bacillus subtilis*, une bactérie gram positive, le cuivre a un effet sur le cycle cellulaire. En effet, dans des conditions favorables, la bactérie se divise par fission binaire, via un cycle cellulaire végétatif. Par contre, dans des conditions environnementales défavorables (variation de concentration des métaux lourds, températures extrêmes, milieu pauvre en nutriments,...), le cycle cellulaire de *B. subtilis* se caractérise par la formation de spores (Fig. 3). Cette adaptation permet à la bactérie de rester en latence le temps que les conditions extérieures redeviennent optimales pour la croissance. Solioz *et al.* ont montré que cette adaptation s'applique aussi pour le cuivre. En effet, lorsque la concentration extracellulaire en cuivre est trop importante, une augmentation de la forme sporulée est observée. Dès que les conditions environnementales sont meilleures, il y a germination des spores et reprise d'un cycle cellulaire végétatif par fission binaire (23).

*Streptomyces spp.* est une bactérie filamenteuse gram positive. Cette bactérie est caractérisée par une croissance mycélienne et par la formation de spores lors du cycle cellulaire. Cependant, des études montrent que les modifications physiologiques et morphologiques sont directement liées à des facteurs environnementaux. En effet, les milieux pauvres en nutriments, tels que l'azote ou le phosphore ou le cuivre, constituent des conditions environnementales induisant un blocage du cycle cellulaire au stade de la sporulation. Comme pour *B. subtilis*, lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables au développement, *Streptomyces spp.* reprend son cycle cellulaire (25).

#### V. *Caulobacter crescentus*

*C. crescentus* est une  $\alpha$ -protéobactérie aquatique, oligotrophe et non pathogène. Cette bactérie est une espèce modèle pour l'étude et la compréhension du cycle cellulaire chez les  $\alpha$ -protéobactéries. Son cycle cellulaire est caractérisé par une division asymétrique générant deux cellules filles morphologiquement et physiologiquement distinctes : une cellule sessile pédonculée et une cellule nageuse flagellée. De récentes études ont montré que les mécanismes responsables de la division asymétrique découverts chez *C. crescentus* sont hautement conservés chez d'autres  $\alpha$ -protéobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia prowazekii*, *Sinorhizobium meliloti*,...) (26). De plus, *C. crescentus* est une espèce pionnière dans les environnements pollués, révélant ainsi la présence de nombreux systèmes de détoxification chez cette espèce (14).



**Figure 4.** Cycle cellulaire de *C. crescentus*. Le cycle cellulaire de *C. crescentus* est caractérisé par une division asymétrique. Seule la forme pédonculée est capable de répliquer son ADN. La cellule flagellée doit donc se différencier en cellule pédonculée avant d'initier la répllication d'ADN. La forme prédivisionnelle est caractérisée par la présence d'un pédoncule, d'un flagelle et de 2 copies du chromosome. La scission de la cellule prédivisionnelle génère deux cellules filles distinctes : une flagellée et une pédonculée. La cellule pédonculée peut directement rentrer dans un autre cycle de division alors que la cellule flagellée doit se différencier.

### a. Cycle cellulaire

Comme mentionné ci-dessus, *C. crescentus* est caractérisée par un cycle cellulaire asymétrique donnant naissance à une cellule sessile pédonculée et une cellule flagellée nageuse.

La division cellulaire et la réplication de l'ADN chez *C. crescentus* sont couplées. En effet, la cellule flagellée est incapable d'initier la réplication de son ADN. Elle doit d'abord se différencier en cellule pédonculée. Une fois différenciée, la réplication de l'ADN est entamée et induit la formation d'une cellule contenant deux chromosomes appelée cellule prédivisionnelle. Cette dernière peut donc alors se diviser, générant deux cellules filles distinctes. (Fig. 4)

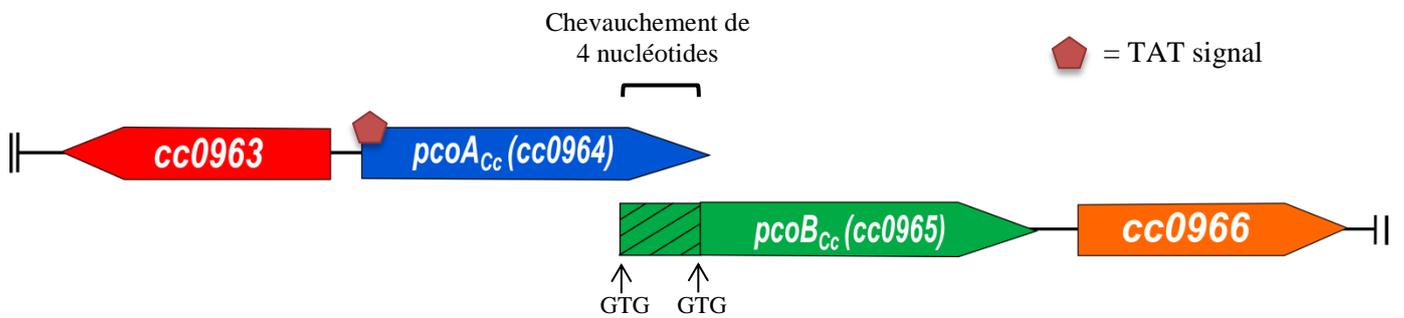
### b. Adaptation de *C. crescentus* face à un stress environnemental

Le cycle cellulaire dimorphique de *C. crescentus* est perçu comme une adaptation face à un environnement changeant. La capacité de la cellule flagellée à se déplacer lui permet d'atteindre des milieux plus favorables pour son développement. En effet, des études ont montré qu'un environnement carencé en azote, carbone ou phosphate provoque un blocage du cycle cellulaire au niveau de la cellule flagellée (blocage G1). Ce blocage favorise la forme flagellée permettant ainsi à la bactérie d'atteindre un milieu plus favorable pour son développement et sa prolifération. La décision d'abandonner la motilité et d'adopter un mode de vie sessile est dès lors fortement influencée par les facteurs environnementaux et la disponibilité des éléments essentiels au développement (27).

*C. crescentus* possède de nombreux systèmes de détoxification lui permettant de coloniser des environnements pauvres en nutriments, une caractéristique des milieux pollués par des métaux lourds (28). Certains systèmes d'homéostasie chez *C. crescentus* ont déjà été caractérisés, c'est le cas du fer.

Comme le cuivre, le fer possède un potentiel redox élevé ce qui en fait un cofacteur essentiel pour de nombreuses enzymes (ferrédoxine, NADH deshydrogénase, nitrogénase,...). Cependant, le  $Fe^{2+}$  peut aussi être toxique en amorçant une réaction de Fenton génératrice de ROS (*Reactive oxygen species*) et, par conséquent, d'un stress oxydant. Chez *C. crescentus*, le principal acteur dans l'homéostasie du fer est la protéine Fur (pour *ferric uptake regulator*), une protéine conservée au sein de nombreuses espèces bactériennes. Une fois lié au  $Fe^{2+}$ , Fur s'associe à l'ADN et active la transcription de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (29).

D'une manière générale, une compréhension des mécanismes de détoxification chez *C. crescentus* permettrait de les appliquer dans des processus de restauration d'environnements contaminés par les métaux lourds.



**Figure 5. Agencement de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans le génome de *C. crescentus*.** *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* sont agencés en opéron avec un chevauchement de 4 nucléotides. Il y a un signal Tat à l'extrémité N-terminale de *pcoA<sub>Cc</sub>*. La séquence nucléotidique de *pcoB<sub>Cc</sub>* possède deux codons « start » potentiels.

### c. Homologies entre *E. coli* et *C. crescentus*

Dans le cadre de la thèse d'Emeline Lawarée, une analyse bioinformatique a été réalisée afin d'identifier des acteurs intervenant dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *C. crescentus* (mémoire de Sébastien Gillet). Cette analyse a révélé la présence de nombreux candidats dont Cc0964 (PcoA<sub>Cc</sub>) et Cc0965 (PcoB<sub>Cc</sub>).

Plusieurs raisons nous ont poussé à étudier ces deux protéines. Premièrement, Cc0964 (PcoA<sub>Cc</sub>) et Cc0965 (PcoB<sub>Cc</sub>) sont respectivement des homologues (avec une *e-value* très faible) de PcoA<sub>Ec</sub>/CueO<sub>Ec</sub> et PcoB<sub>Ec</sub> chez *E. coli*. Deuxièmement, ces deux protéines sont annotées comme des « *copper binding proteins* ». PcoA<sub>Cc</sub> contient également quatre sites de liaison au cuivre prédits. De plus, à l'extrémité N-terminale, *pcoA<sub>Cc</sub>* possède un motif Twin-Arginine lui permettant de passer du cytoplasme vers le périplasme via la voie TAT. Troisièmement, *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* sont agencés en opéron avec un chevauchement de 4 nucléotides (Fig. 5). Concernant l'environnement génique de ces deux gènes, le gène *cc0963* est orienté en sens inverse par rapport à l'opéron et code pour un régulateur transcriptionnel de 16 kD. Le gène *cc0966* est, quant à lui, situé en aval et orienté dans le même sens que l'opéron. Il code pour une ligase de 57 kD impliquée probablement dans la synthèse des acides gras à longue chaîne.

Enfin, deux études transcriptionnelles ont montrées que *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* semblent régulés au cours du cycle cellulaire (27) (30). Ces deux gènes semblent également contrôlés par CtrA, le *master* régulateur du cycle cellulaire. Cependant, aucune boîte CtrA n'a été trouvée en amont de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* (30).

Au cours du mémoire de S. Gillet, il a été démontré que PcoA<sub>Cc</sub> et/ou PcoB<sub>Cc</sub> jouent un rôle dans l'homéostasie du cuivre. En effet, la souche CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>* montre une plus grande sensibilité au cuivre que la souche sauvage CB15N.



## VI. Objectifs du mémoire

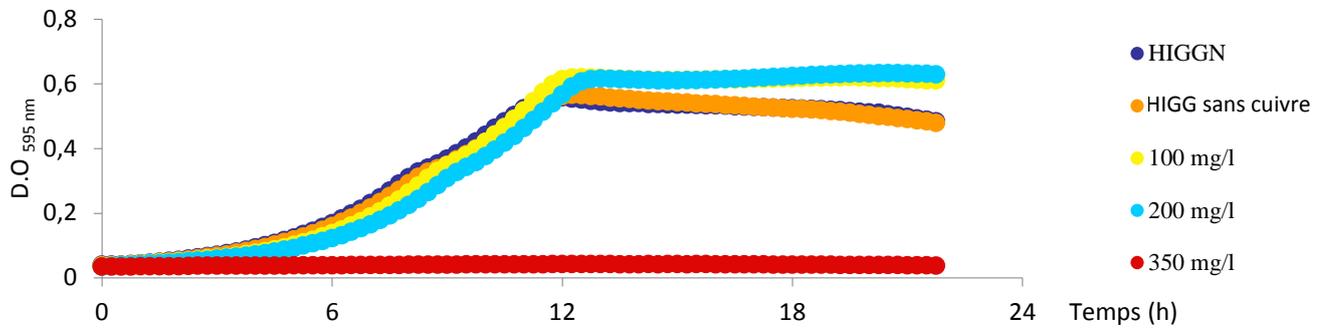
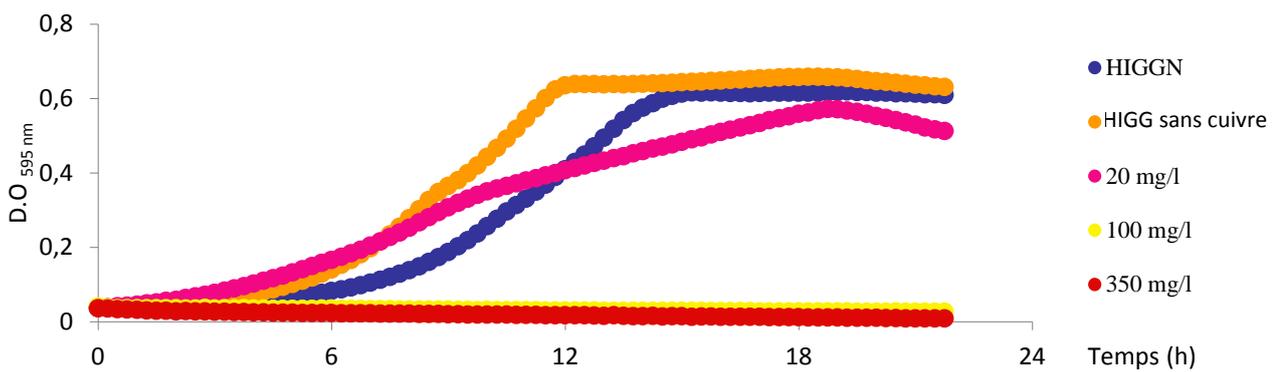
L'aptitude de *Caulobacter crescentus* à survivre dans des milieux pollués en fait une espèce modèle pour l'étude de la résistance au cuivre. Au cours du mémoire de S. Gillet, une étude bioinformatique a permis d'identifier deux protéines (PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub>) prédites pour jouer un rôle dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*. La souche double délétante CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> montre une sensibilité accrue au cuivre, confirmant le rôle potentiel de PcoA<sub>Cc</sub> et/ou PcoB<sub>Cc</sub> dans la réponse à un stress cuivré.

L'objectif majeur de ce mémoire est de caractériser indépendamment le rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et de PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*. La présence de deux codons « start » dans l'ORF de pcoB<sub>Cc</sub> interroge sur la taille réelle de PcoB<sub>Cc</sub> et fera l'objet d'investigations.

Pour ce faire, différentes souches *knock-out* (CB15NΔpcoA<sub>Cc</sub> et CB15BΔpcoB<sub>Cc</sub>) ainsi que les versions complémentées seront créées. Afin d'étudier leur sensibilité au cuivre, ces souches seront cultivées dans des milieux contenant différentes concentrations en CuSO<sub>4</sub>. Finalement, des qRT-PCR seront réalisées permettant l'étude du taux de transcription des gènes pcoA<sub>Cc</sub> et pcoB<sub>Cc</sub> dans les différentes souches. En combinant l'ensemble des résultats obtenus, nous essayerons d'estimer la taille de l'ORF de pcoB<sub>Cc</sub>.



# Résultats

**A.****CB15N****B.****CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub>**

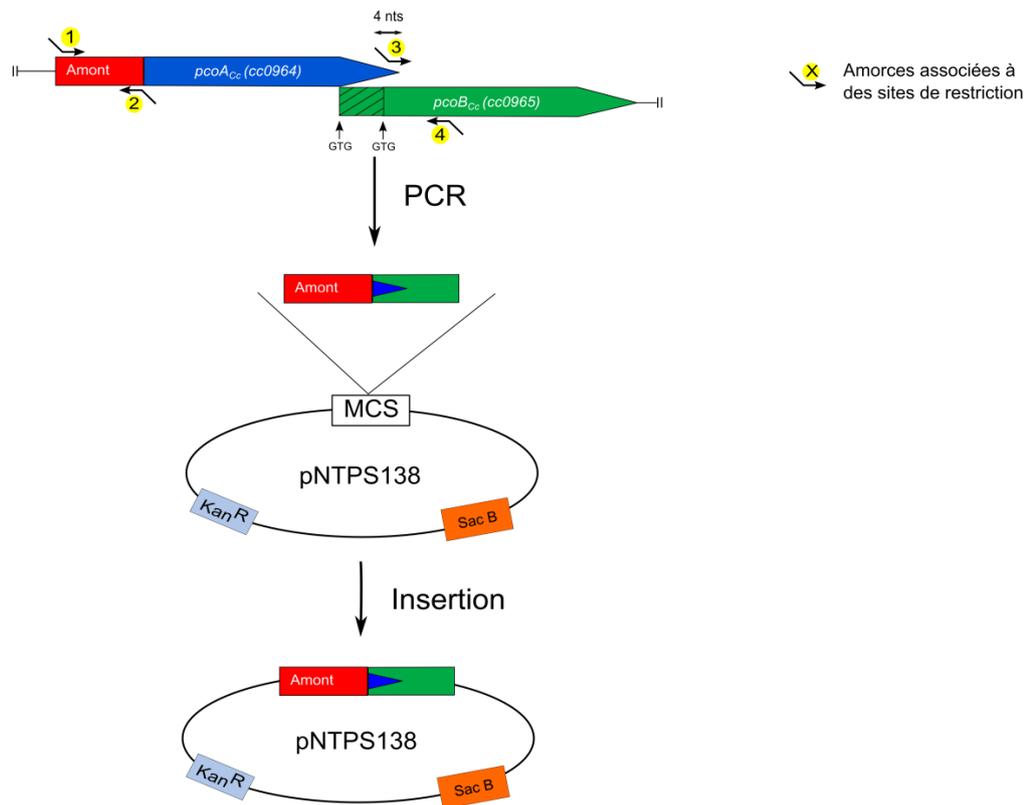
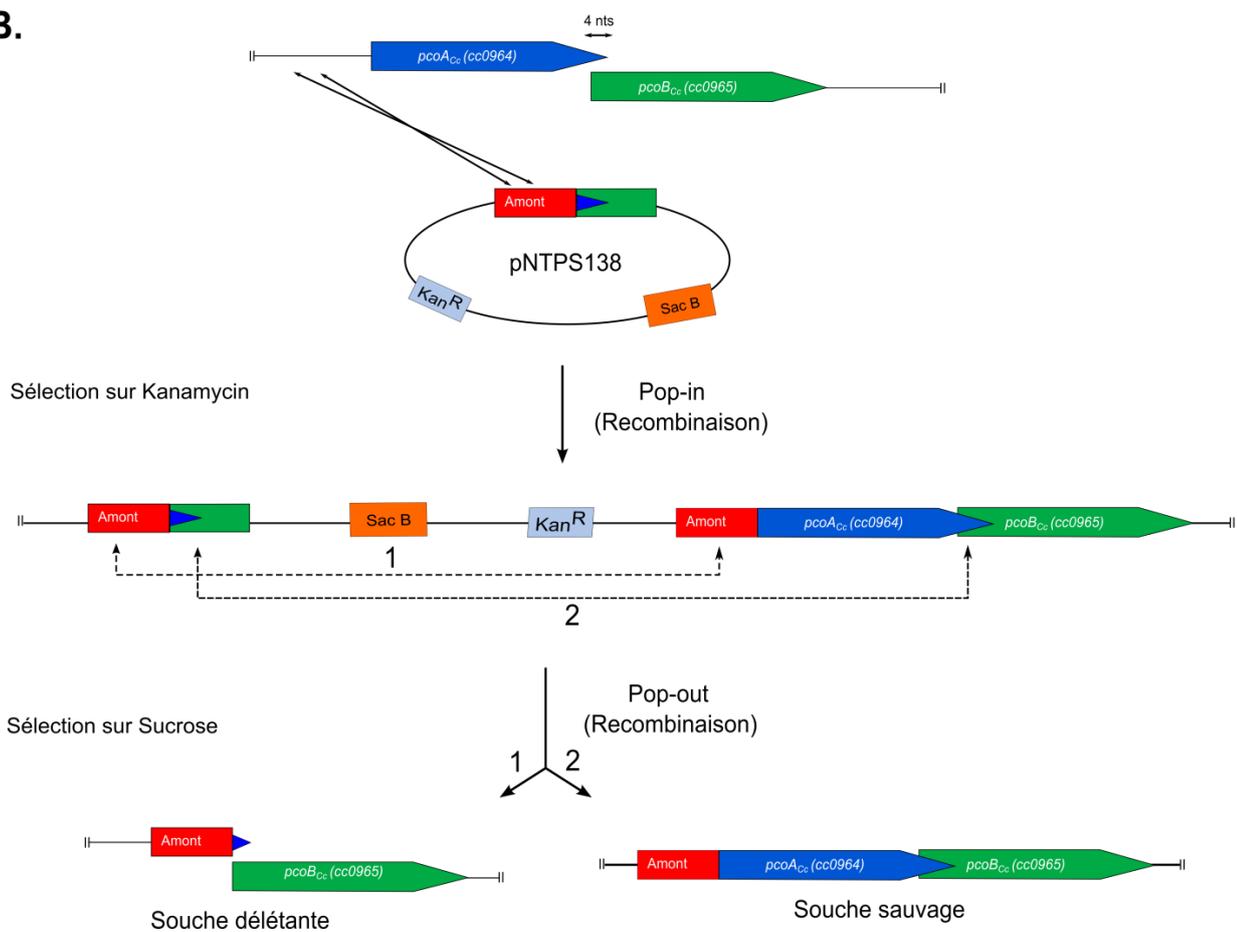
**Figure 6. Profil de croissance de la CB15N et de la CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub>.** Les souches (A) CB15N et (B) CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub> sont cultivées en HIGG sans cuivre contenant différentes concentrations en CuSO<sub>4</sub>. La densité optique 595nm est mesurée toutes les 15 minutes. La souche CB15N ne croît plus en présence de 350 mg/l de CuSO<sub>4</sub> alors que la souche double délétante a une croissance nulle à partir de 100 mg/l de CuSO<sub>4</sub>.

## **I. La souche double délétante CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub> montre une sensibilité accrue au cuivre par rapport à la souche sauvage CB15N**

Avant de caractériser indépendamment le rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*, la croissance de la souche CB15NpcoAB<sub>Cc</sub> a été comparée à celle de la souche sauvage dans des milieux contenant différentes concentrations en cuivre.

La souche sauvage CB15N possède une résistance importante à un stress cuivré puisqu'elle présente une croissance « normale » tant que la concentration extracellulaire en cuivre n'excède pas 200 mg/l (Fig. 6A).

Au cours du mémoire de S. Gillet, il a été montré que la souche CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub> possédait une sensibilité accrue au cuivre puisque, en présence de 100 mg/l de CuSO<sub>4</sub>, la croissance de cette souche est nulle (Fig. 6B), indiquant un rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et/ou PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *C. crescentus*.

**A.****B.**

**Figure 7. Exemple de stratégie de clonage utilisée pour la création de souche délétante CB15NΔ*pcoA<sub>cc</sub>*.** (A) Amplification des régions homologues et intégration dans le plasmide intégratif (pNTPS138) à l'aide de 4 amorces. (B) Description de la recombinaison en deux étapes pop-in/pop-out.

## II. Stratégie utilisée pour la construction de souches délétantes et complémentées

### a. Création de souches délétantes

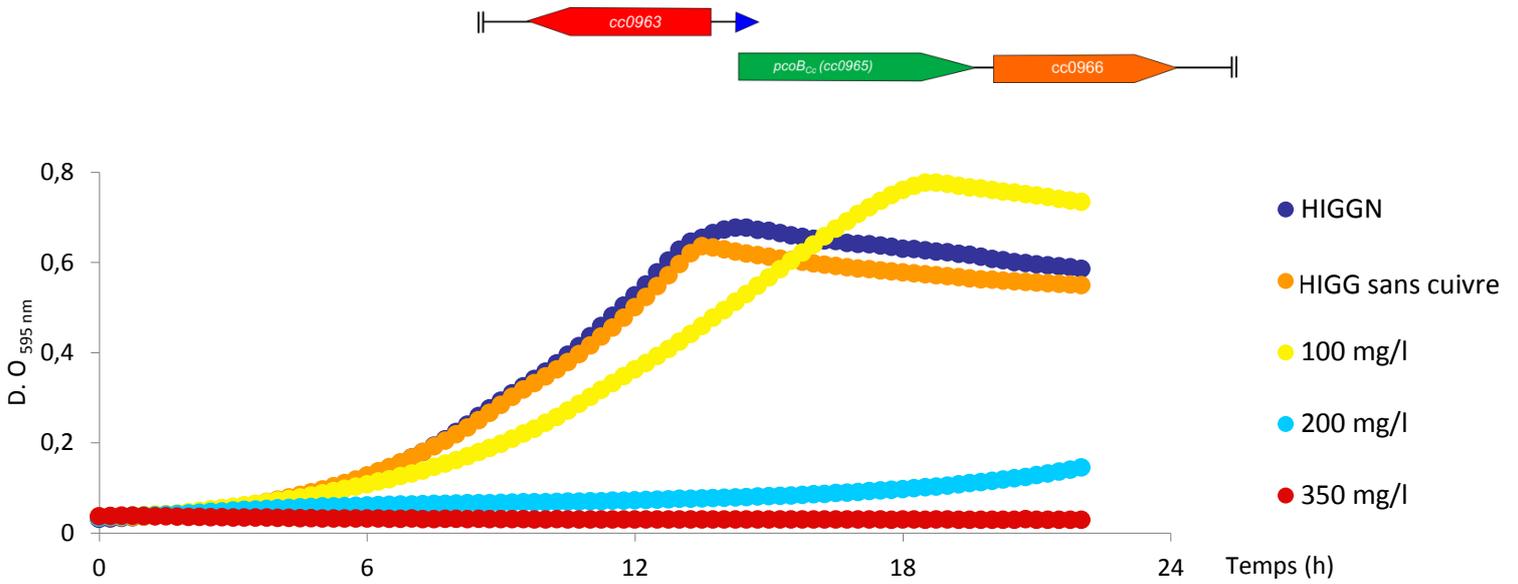
Afin de caractériser indépendamment le rôle de  $PcoA_{Cc}$  et  $PcoB_{Cc}$  dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *C. crescentus*, des souches délétantes pour chaque gène ont été créées.

D'une manière générale, 500 pb en amont et en aval du gène à déléter sont amplifiées par PCR en utilisant respectivement la paire d'amorces (1-2) et (3-4) (Fig. 2A). Il est important de mentionner que les quatre amorces utilisées contiennent des sites de restriction. Les produits PCR 1 et PCR 2 sont ensuite digérés par XbaI aux extrémités 5' et 3', respectivement. Ces 2 produits PCR digérés sont utilisés comme matrice pour une troisième PCR avec les amorces 1 et 4 afin de générer un seul fragment de 1 kb contenant les régions amont et aval. Ce fragment est à son tour digéré par des enzymes de restriction ciblant les sites de restriction introduits dans les amorces 1 et 4, puis cloné dans le plasmide non-répliquatif pNTPS138 (Fig. 7A). Ce plasmide est ensuite transformé dans une souche conjugative d'*E.coli*. Après conjugaison, le plasmide pNTPS138 contenant le fragment d'intérêt est introduit chez *C. crescentus*.

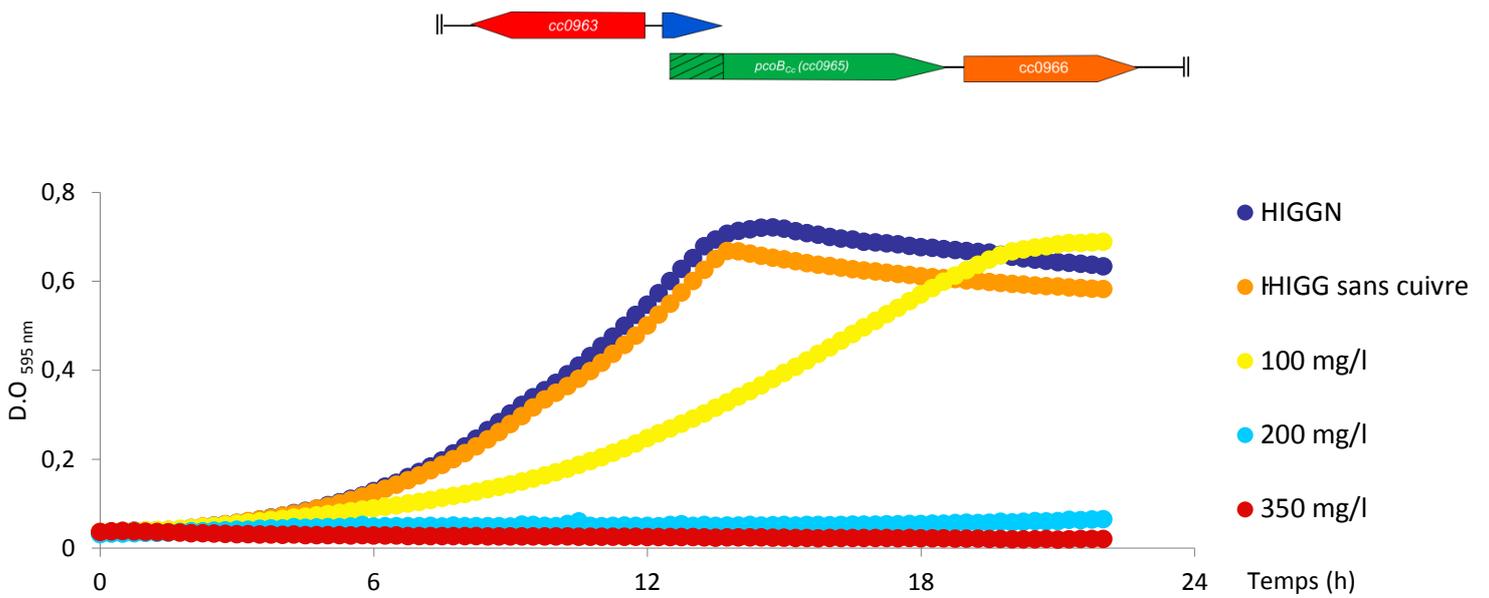
La délétion propre du gène d'intérêt est effectuée par un processus de recombinaison en deux étapes pop-in/pop-out. Afin d'identifier les bactéries qui ont intégré le plasmide pNTPS138 (première recombinaison), une première sélection sur un milieu contenant de la kanamycine est réalisée (Fig. 7B). Un second événement de recombinaison conduisant à l'élimination du vecteur, et éventuellement du gène d'intérêt, est sélectionné sur un milieu contenant du sucrose. En effet, le pNTPS138 porte un gène *sacB* dont l'expression confère une sensibilité au sucrose. Enfin, une PCR diagnostique est nécessaire afin de distinguer les clones sauvages des clones délétants.

En se basant sur les informations bio-informatiques, Le poids moléculaire de  $PcoB_{Cc}$  est estimé à 35,4 kDa. Pourtant, lors du mémoire de S. Gillet, un *wb* a révélé un poids de 44 kDa pour  $PcoB_{Cc}$ -3Flag. En raison de l'incertitude sur la longueur de la séquence codante de *pcoB\_{Cc}*, deux souches délétantes  $CB15N\Delta pcoA_{Cc}$  ont été créées:  $CB15N\Delta pcoA_{Cc}$  ( $PcoB_{Cc}$  = 32 kDa) et  $CB15N\Delta pcoA_{Cc}$  ( $PcoB_{Cc}$  = 44 kDa). Une souche délétante pour *pcoB\_{Cc}* ( $CB15N\Delta pcoB_{Cc}$ ) a également été générée au cours du mémoire.

### A. CB15NΔ*pcoA*<sub>Cc</sub> (PcoB<sub>Cc</sub> = 32 kDa)



### B. CB15NΔ*pcoA*<sub>Cc</sub> (PcoB<sub>Cc</sub> = 44 kDa)



**Figure 8. Profil de croissance des deux souches CB15NΔ*pcoA*<sub>Cc</sub>.** Les souches délétées sont cultivées en HIGG<sub>sans cuivre</sub> contenant différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. La densité optique<sub>595 nm</sub> est mesurée toutes les 15 min. Une croissance nulle est observée à partir de 200 mg/l de CuSO<sub>4</sub> est observée pour les deux souches.

## b. Les souches délétantes montrent une sensibilité accrue au cuivre

Afin de déterminer la sensibilité au cuivre des souches délétantes, des courbes de croissance ont été réalisées. Les différentes souches ont été cultivées pendant 24 h dans de l'HIGG sans cuivre contenant différentes concentrations en  $\text{CuSO}_4$ . La densité optique  $_{595\text{ nm}}$  a été mesurée toutes les 15 min.

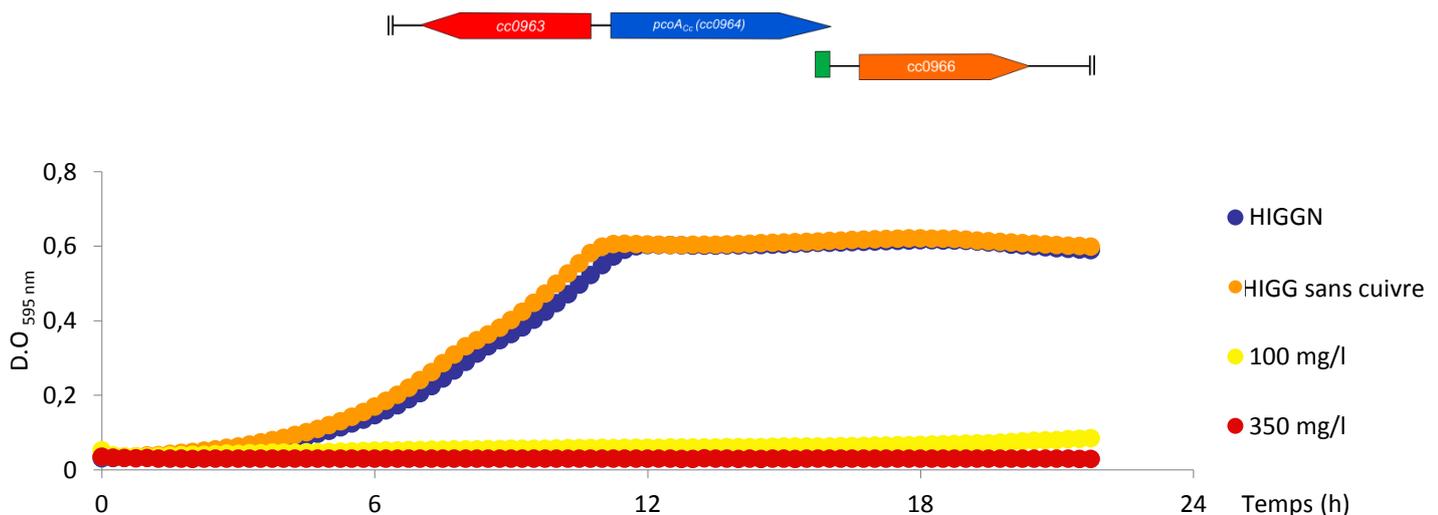
Afin de caractériser de manière plus précise le rôle respectif de chacun de ces acteurs, les 3 souches délétantes ( $\text{CB15N}\Delta pcoA_{Cc}$  ( $PcoB_{Cc} = 32\text{kDa}$ ),  $\text{CB15N}\Delta pcoA_{Cc}$  ( $PcoB_{Cc} = 44\text{kDa}$ ) et  $\text{CB15N}\Delta pcoB_{Cc}$ ) ont également été cultivées en présence de différentes concentrations de  $\text{CuSO}_4$ . A première vue, les courbes de croissance pour les deux souches  $\text{CB15N}\Delta pcoA_{Cc}$  présentent un profil similaire. A  $100\text{ mg/l}$  de  $\text{CuSO}_4$ , la croissance est ralentie par rapport à la  $\text{CB15N}$  (Fig. 8A ; Fig. 8B). Les deux souches délétantes pour  $pcoA_{Cc}$  montrent donc une sensibilité accrue au cuivre par rapport à la souche sauvage  $\text{CB15N}$ .

Le profil de croissance de la souche  $\text{CB15N}\Delta pcoB_{Cc}$  présente des similitudes avec celui de la souche  $\text{CB15N}\Delta pcoAB_{Cc}$  (Fig. 9; Fig. 6B). En effet, à partir de  $100\text{ mg/l}$  de  $\text{CuSO}_4$ , la croissance de cette souche est nulle.

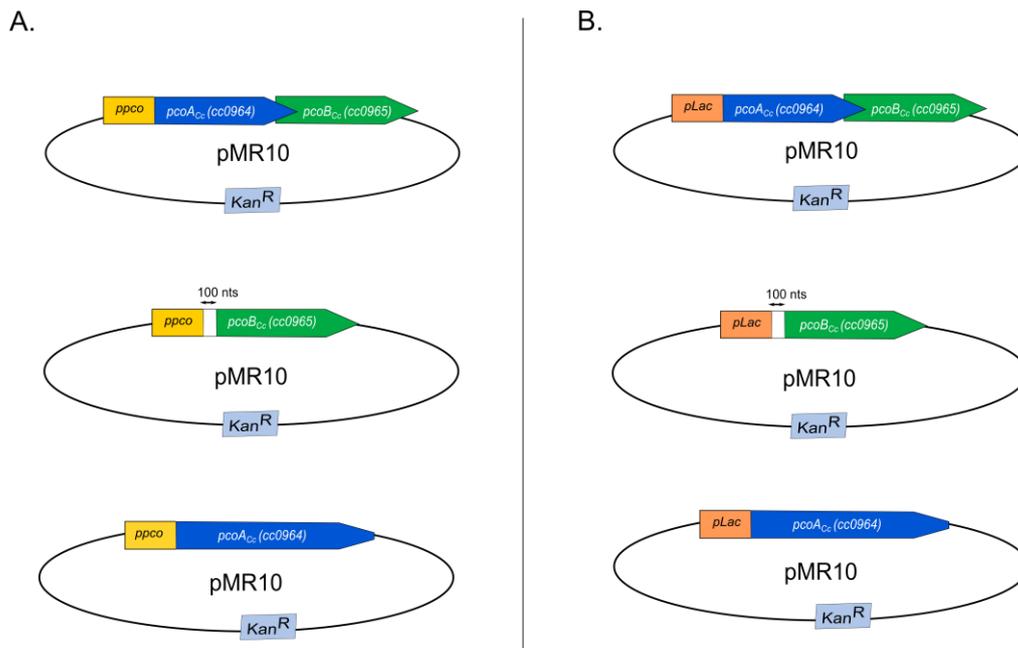
De manière intéressante, la  $\text{CB15N}\Delta pcoB_{Cc}$  semble être plus sensible que les  $\text{CB15N}\Delta pcoA_{Cc}$ . Il est possible que  $pcoA_{Cc}$  ne joue qu'un rôle secondaire dans l'homéostasie du cuivre en tant que transporteur ou régulateur de transcription.

## C.

### $\text{CB15N}\Delta pcoB_{Cc}$



**Figure 9. Profil de croissance de la  $\text{CB15N}\Delta pcoB_{Cc}$ .** La souche délétée est cultivée en HIGG sans cuivre contenant différentes concentrations en  $\text{CuSO}_4$ . La densité optique  $_{595\text{ nm}}$  est mesurée toutes les 15 min. Cette souche présente une croissance nulle à partir de  $100\text{ mg/l}$  de  $\text{CuSO}_4$ .



**Figure 10. Différentes constructions pour la stratégie de complémentation.** Les souches délétantes sont complétementées par des constructions plasmidiques pMR10 contenant le(s) gène(s) d'intérêt ( $pcoA_{Cc}$ ;  $pcoB_{Cc}$  ou  $pcoAB_{Cc}$ ) se trouvant (A) soit sous le contrôle du promoteur « endogène » ( $ppco$ ) (B) soit sous le contrôle du promoteur fort ( $pLac$ ). Les 100 pb entre le promoteur et le gène contiennent théoriquement le RBS (*ribosome binding site*).

| Souches   | Plasmides                                     | Compl. |
|---|---|--------|
| CB15NΔ $pcoAB_{Cc}$   | pMR10 $ppcopcoAB_{Cc}$                        | non    |
| CB15NΔ $pcoA_{Cc}$ (PcoB $_{Cc}$ = 32 kDa) et (PcoB $_{Cc}$ = 44 kDa) | pMR10 $ppcopcoAB_{Cc}$                        | oui    |
|   | pMR10 $pcoA_{Cc}$                             | non    |
|   | pMR10 $ppcopcoA_{Cc}$                         | non    |
| CB15NΔ $pcoB_{Cc}$  | pMR10 $ppcopcoAB_{Cc}$                        | oui    |
|   | pMR10 $pcoB_{Cc}$ (PcoB $_{Cc}$ = 32 kDa)     | oui    |
|   | pMR10 $ppcopcoB_{Cc}$ (PcoB $_{Cc}$ = 32 kDa) | non    |

**Tableau 2. Tableau récapitulatif des souches complétementées.** La complémentation des souches délétantes se fait à l'aide du pMR10 portant les gènes d'intérêt ( $pcoA_{Cc}$ ,  $pcoB_{Cc}$  ou  $pcoAB_{Cc}$ ). Le promoteur endogène ( $ppco$ ) est comparé à un promoteur fort ( $pLac$ ) afin de vérifier l'importance du promoteur dans les différentes constructions. La CB15NΔ $pcoA_{Cc}$  (PcoB $_{Cc}$  = 32 kDa) et la CB15NΔ $pcoA_{Cc}$  (PcoB $_{Cc}$  = 44 kDa) ont été regroupées car elles présentaient le même phénotype.

### III. Construction et étude de la croissance des souches complémentées

#### a. Création de souches complémentées

De manière à s'assurer que les phénotypes observés pour les souches délétantes sont bien liés à la délétion du gène et non à un effet polaire, toutes les souches délétantes étudiées ont été complémentées avec un plasmide portant une copie du gène d'intérêt en *trans*.

Pour ce faire, le plasmide pMR10 (plasmide centromérique à "faible copie") portant le gène d'intérêt approprié, sous le contrôle du promoteur endogène ou d'un promoteur fort (*plac*), est introduit dans les souches délétantes (Fig. 10).

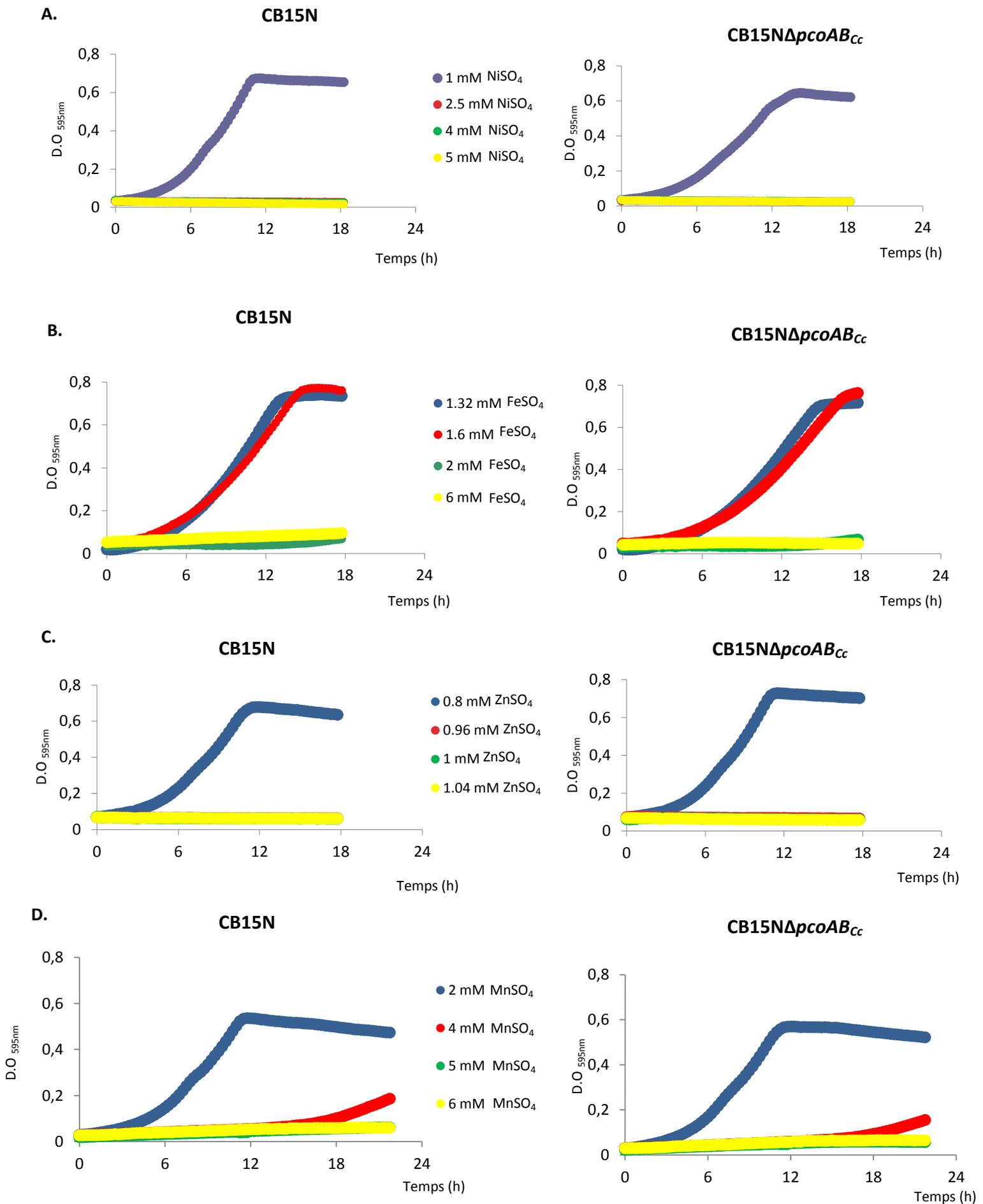
#### b. Etude de la croissance des différentes souches complémentées

Afin de vérifier que les gènes délétés sont bien responsables des phénotypes observés pour les différents mutants, une copie du gène d'intérêt est exprimée en *trans*.

Les souches complémentées par les différentes constructions ont été cultivées pendant 24 h dans de l'HIGG sans cuivre contenant différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. La densité optique est mesurée par un spectromètre d'absorption à 660 nm aux temps 0 h, 8 h et 24 h.

Les résultats obtenus sont regroupés dans un tableau récapitulatif (Tab. 2). Pour la souche CB15NΔ*pcoA*<sub>Cc</sub>, il est impossible de la compléter à moins d'apporter en *trans* la copie des deux gènes *pcoAB*<sub>Cc</sub> (que ce soit sous le contrôle du promoteur « endogène » *ppco* ou sous le promoteur fort *pLac*).

La souche CB15NΔ*pcoB*<sub>Cc</sub> est, quant à elle, complémentée quand une copie de *pcoB*<sub>Cc</sub> (PcoB<sub>Cc</sub> = 32 kDa) est exprimée en *trans*. Deux informations sont tirées de cette observation. Premièrement, ceci montre bien que PcoB<sub>Cc</sub> est impliquée dans l'homéostasie du cuivre. Deuxièmement, la taille de PcoB<sub>Cc</sub> est égale à 32 kDa.



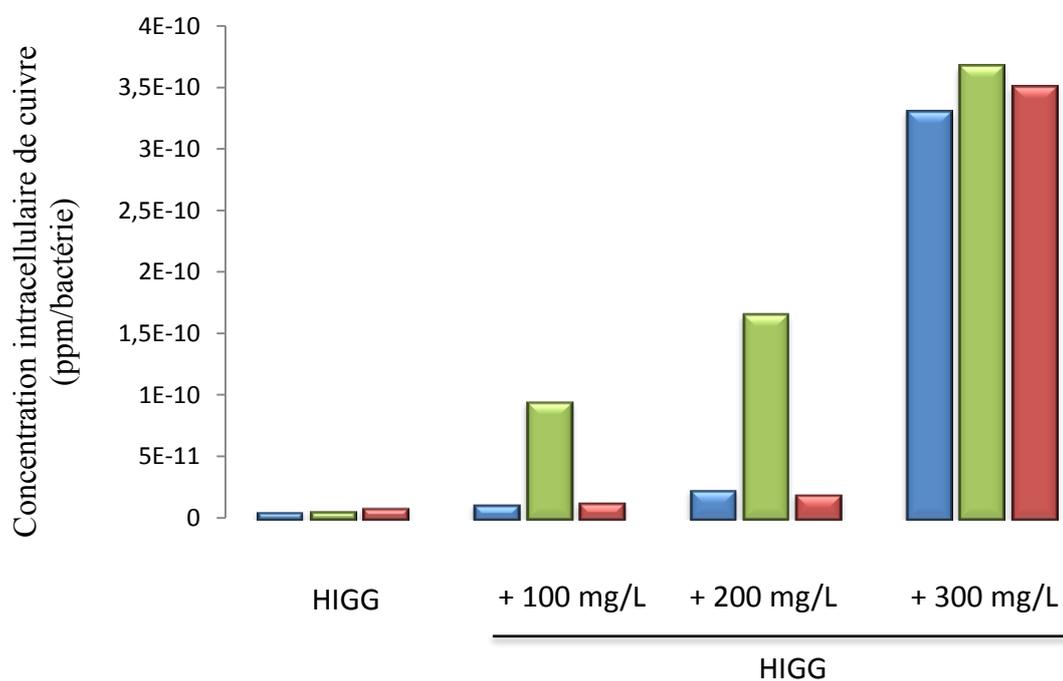
**Figure 11. Comparaison des courbes de croissance de la CB15N et la CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> en présence de différents métaux lourds.** Les souches ont été cultivées avec différentes concentrations de métaux : **A.** de NiSO<sub>4</sub>. **B.** de FeSO<sub>4</sub>. **C.** de ZnSO<sub>4</sub>. **D.** de MnSO<sub>4</sub>. On remarque que pour tous les métaux, la CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> présente le même phénotype que la souche sauvage.

**c. PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> semblent être spécifiques de l'homéostasie du cuivre**

Afin de s'assurer que PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> interviennent dans un mécanisme spécifique du cuivre, les souches CB15N et CB15N $\Delta$ pcoAB<sub>Cc</sub> ont été cultivées pendant 24 h dans des milieux contenant différentes concentrations de métaux lourds (Fe, Zn, Mn, Ni).

De manière intéressante, aucune différence significative n'est observée entre les deux souches pour les différents métaux testés, suggérant que PcoA<sub>Cc</sub> et PcoB<sub>Cc</sub> sont deux protéines spécifiques de l'homéostasie du cuivre (Fig. 11).

|          | CB15N       | CB15N $\Delta$ <i>pcoAB</i> <sub>Cc</sub> | CB15N $\Delta$ <i>pcoAB</i> <sub>Cc</sub> pMR10 <i>ppcopcoAB</i> <sub>Cc</sub> |
|----------|-------------|---|--|
| HIGG     | 5,19439E-12 | 5,72883E-12                               | 8,42105E-12  |
| 100 mg/L | 1,11084E-11 | 9,46586E-11                               | 1,25617E-11  |
| 200 mg/L | 2,2916E-11  | 1,6596E-10                                | 1,94903E-11  |
| 290 mg/L | 3,3041E-10  | 3,6755E-10                                | 3,51109E-10  |



**Figure 12. Quantification du cuivre intracellulaire dans les souches CB15N, CB15N $\Delta$ *pcoAB*<sub>Cc</sub> et CB15N $\Delta$ *pcoAB*<sub>Cc</sub> pMR10*ppcopcoAB*<sub>Cc</sub>.** Les trois souches sont cultivées dans un milieu HIGG contenant différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. La quantité de cuivre absorbée est mesurée (ppm/bactérie) à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique. Les mesures sont répertoriées dans le tableau.

#### **d. Analyse comparative de l'accumulation de cuivre intracellulaire**

Afin de déterminer si  $PcoA_{Cc}$  et/ou  $PcoB_{Cc}$  interviennent dans le maintien de l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*, le contenu intracellulaire de différentes souches a été analysé par spectrométrie d'absorption atomique.

Les souches ont été cultivées pendant 24 h en HIGG contenant différentes concentrations en  $CuSO_4$ . Les bactéries ont ensuite été lavées puis lysées afin de libérer leur contenu intracellulaire dans le surnageant. La concentration intracellulaire en cuivre par bactérie est obtenue en confondant les concentrations intracellulaires en cuivre mesurées à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique avec le comptage des bactéries dans chaque échantillon.

De manière intéressante, à certaines concentrations extracellulaires (100 et 200 mg/l de  $CuSO_4$ ), il semble que la souche  $CB15N\Delta pcoAB_{Cc}$  accumule plus de cuivre que la  $CB15N$ . A 300 mg/l de  $CuSO_4$  la souche sauvage et la double délétante ont le même phénotype. Elles présentent une concentration intracellulaire en cuivre significativement plus élevée que dans les autres conditions. Ceci est cohérent avec le fait qu'à cette concentration la  $CB15N$  ne croît plus suggérant une perturbation de l'homéostasie du cuivre comme dans la  $CB15N\Delta pcoAB_{Cc}$ .

De plus, la  $CB15N\Delta pcoAB_{Cc}$   $pMR10ppcopcoAB_{Cc}$  retrouve une concentration intracellulaire semblable à celle de la  $CB15N$ . Toutes ces observations suggèrent fortement que  $PcoA_{Cc}$  et/ou  $PcoB_{Cc}$  sont impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus* (Fig. 12).

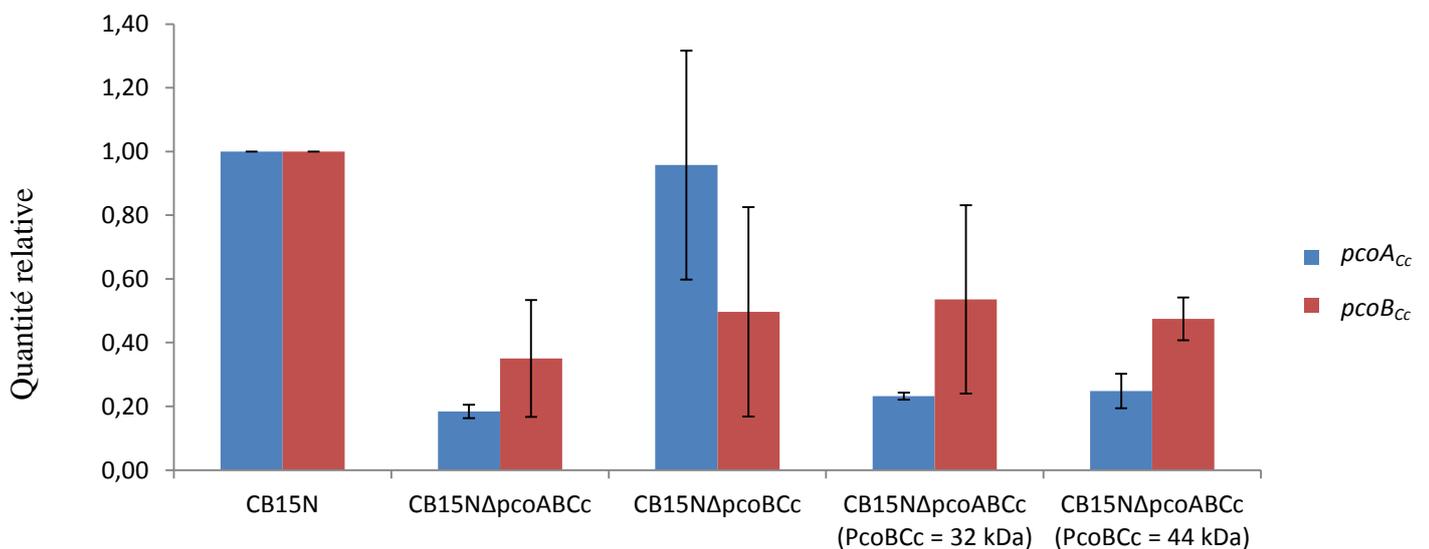
## A. Moyennes des $C_T$ dans les souches délétantes

|  | <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> | <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> | <i>ARN16S<sub>Cc</sub></i> |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| CB15N  | 28,91449                 | 29,97372                 | 8,53830                    |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoAB<sub>Cc</sub></i>                                     | 31,13513                 | 31,11029                 | 8,36055                    |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoB<sub>Cc</sub></i>                                      | 29,55792                 | 30,24785                 | 7,92372                    |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> = 32 kDa) | 30,80951                 | 30,57802                 | 8,24164                    |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> = 44 kDa) | 31,19852                 | 31,31546                 | 8,80386                    |

## B. Moyennes des $C_T$ dans les contrôles négatifs

|  | <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> | <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> |
|--|--------------------------|--------------------------|
| CB15N  | 31,45311451              | 33,20433998              |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoAB<sub>Cc</sub></i>                                     | 31,33167171              | 31,45810604              |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoB<sub>Cc</sub></i>                                      | 31,0870142               | 30,39146709              |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> = 32 kDa) | 31,22775459              | 32,84207726              |
| CB15N $\Delta$ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> = 44 kDa) | 30,93649864              | 32,54977417              |

## C. Quantité relative de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans les souches délétantes



**Figure 13.  $C_T$  et quantité relative d'ARN correspondant aux gènes d'intérêt dans les souches non complémentées. (A)** Le tableau regroupe les moyennes des  $C_T$  obtenues pour *pcoA<sub>Cc</sub>*, *pcoB<sub>Cc</sub>* et l'*ARN16S<sub>Cc</sub>*. **(B)** Le tableau regroupe les moyennes des  $C_T$  des contrôles négatifs correspondant au bruit de fond. Le fait que ces valeurs soient très proches des  $C_T$  des souches délétantes rend la détection approximative. **(C)** Le graphique exprime la quantité relative de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans les différentes souches par rapport à la CB15N

#### e. Analyse quantitative de la transcription de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*

Afin de vérifier la transcription de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans les différentes souches, la quantité d'ARNm correspondant aux deux gènes d'intérêt a été quantifiée par qRT-PCR.

La faible variation de la quantité d'*ARNI6S* dans les différentes souches autorise la normalisation des résultats de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* par rapport à l'*ARNI6S* (Fig. 6A). Pourtant, après normalisation les résultats semblent aberrants. Par exemple, dans la souche CB15N*pcoAB<sub>Cc</sub>* les deux gènes semblent être transcrits alors que théoriquement, ils ne sont pas présents (Fig. 13A). Ces aberrations peuvent être expliquées en partie par le fait que les C<sub>T</sub> (Cycle Threshold) obtenus pour *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* sont très proches du C<sub>T</sub> correspondant au bruit de fond rendant la détection très approximative. En effet, l'écart s'établit entre 2 et 3 cycles (Fig. 13A ; Fig. 13B).

De manière inattendue, la comparaison entre les C<sub>T</sub> de l'*ARNI6S<sub>Cc</sub>* des souches complémentées par le pMR10 vide et ceux des souches délétantes montre une variation importante. Entre la CB15NpMR10 et la CB15N l'écart est de 5 cycles (Fig. 13A ; Fig. 14A). Les C<sub>T</sub> de l'*ARNI6S* dans les souches complémentées par le pMR10 contenant le gène approprié sont encore différents des deux autres conditions (Fig. 14B).

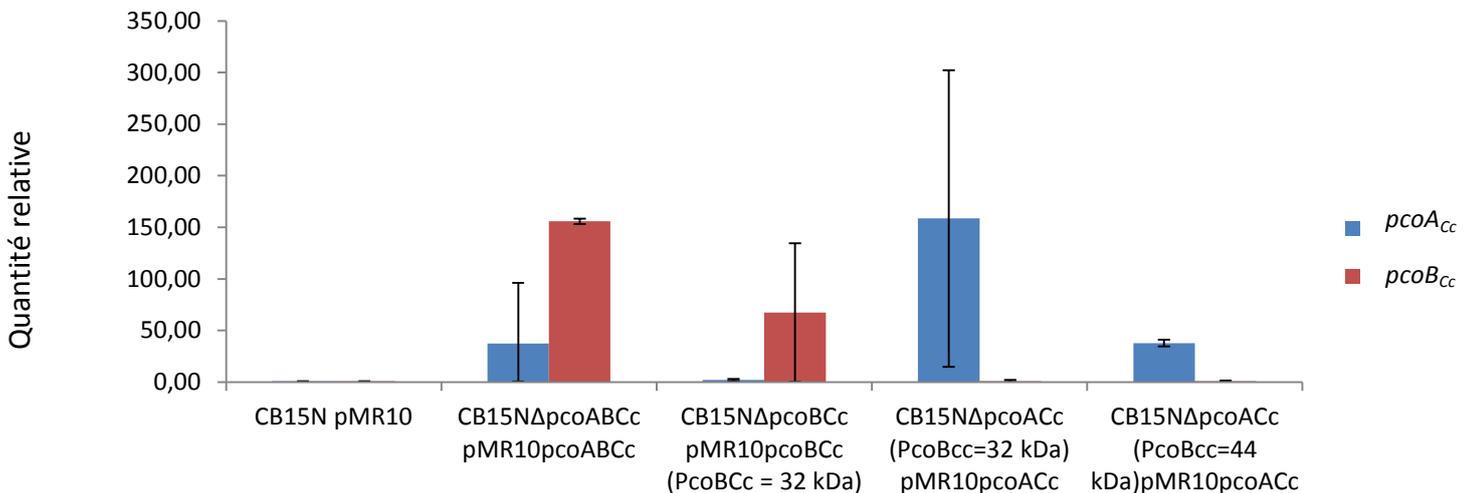
### A. Moyenne des C<sub>T</sub> dans les souches complémentées par le pMR10 vide

|  | <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> | <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> | <i>ARN16S<sub>Cc</sub></i> |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| CB15N pMR10  | 30,52787304              | 31,96277332              | 13,2003174                 |
| CB15NΔ <i>pcoAB<sub>Cc</sub></i> pMR10                                     | 31,01641941              | 32,0177536               | 11,6114492                 |
| CB15NΔ <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> pMR10                                      | 30,23328876              | 31,87026501              | 12,9060369                 |
| CB15NΔ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> = 32 kDa) pMR10 | 31,19616127              | 31,99669838              | 13,0367813                 |
| CB15NΔ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> = 44 kDa) pMR10 | 31,04052544              | 32,38520813              | 14,2137661                 |

### B. Moyenne des C<sub>T</sub> dans les souches complémentées par le pMR10 portant le gène approprié

|   | <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> | <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> | <i>ARN16S<sub>Cc</sub></i> |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| CB15NΔ <i>pcoAB<sub>Cc</sub></i> pMR10 <i>pcoAB<sub>Cc</sub></i>                                    | 24,050369                | 24,734059                | 10,1528101                 |
| CB15NΔ <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> pMR10 <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> = 32 kDa) | 29,134440                | 25,795311                | 10,709877                  |
| CB15NΔ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> =32 kDa) pMR10 <i>pcoA<sub>Cc</sub></i>  | 23,886213                | 31,874758                | 10,2154794                 |
| CB15NΔ <i>pcoA<sub>Cc</sub></i> ( <i>PcoB<sub>Cc</sub></i> =44 kDa) pMR10 <i>pcoA<sub>Cc</sub></i>  | 25,798416                | 32,351895                | 12,5901136                 |

### C. Quantité relative de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans les souches complémentées



**Figure 14. C<sub>T</sub> et quantité relative d'ARNm correspondant aux gènes d'intérêt dans les souches complémentées. A.** Moyennes des C<sub>T</sub> correspondant aux souches complémentées par le pMR10 vide. **B.** Moyennes des C<sub>T</sub> correspondant aux gènes *pcoA<sub>Cc</sub>*, *pcoB<sub>Cc</sub>* et *ARN16S* dans les souches complémentées par le pMR10 contenant le(s) gène(s) approprié(s) sous le contrôle du pLac. **C.** Le graphique exprime la quantité relative de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans les souches complémentées par le pMR10 portant le(s) gène(s) approprié(s) par rapport à la CB15N. Ces résultats sont obtenus en soustrayant les C<sub>T</sub> des souches complémentées par le pMR10 portant le(s) gène(s) d'intérêt aux C<sub>T</sub> des souches complémentées par le pMR10 vide correspondants. Les quantités relatives sont obtenues par la formule suivante :  $2^{\Delta C_T}$ . L'absence de complémentation explique pourquoi les écarts types sont si importants.

La variabilité observée pour les  $C_T$  de l'*ARN16S<sub>Cc</sub>* rend la normalisation impossible. Les  $C_T$  de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* des souches complémentées par le pMR10 portant le(s) gène(s) approprié(s) ont donc été comparés à ceux des souches complémentées par le pMR10 vide (Fig. 14A ; Fig. 14B). Les résultats, qui sont présentés sous forme de graphique, montrent uniquement que les gènes d'intérêts sont surexprimés lorsqu'ils sont transcrits à partir du plasmide sous le contrôle du promoteur fort *plac* (Fig. 14C). Ceci concorde avec le fait que les gènes sont sous le contrôle d'un promoteur fort.



**Discussion**  
**et**  
**perspectives**



## Homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*

Les résultats obtenus lors d'un mémoire précédent (S. Gillet) suggèrent l'implication de PcoA<sub>Cc</sub> et/ou PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus en spectrométrie d'absorption atomique. En effet, la souche CB15NΔ*pcoAB*<sub>Cc</sub> accumule plus de cuivre que la souche CB15N, suggérant l'incapacité de la bactérie à éjecter le cuivre du cytoplasme. L'absence des deux gènes entraîne donc une perturbation dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre. L'objectif principal de ce mémoire est de caractériser le rôle de ces protéines de manière indépendante.

Chez *C. crescentus*, les mécanismes de détoxification du cuivre semblent efficaces et finement régulés. En effet, ils confèrent une résistance importante au stress cuivré permettant à la souche CB15N de croître dans des milieux contenant jusqu'à 350 mg/l de CuSO<sub>4</sub>. A titre de comparaison, *Pseudomonas syringae* présente un seuil critique pour sa croissance à 200 mg/l. Par contre, *E. coli* tolère des concentrations allant jusqu'à 1500 mg/l (31) (32). Par ailleurs, une faible augmentation de la concentration intracellulaire en cuivre entraîne directement une perturbation dans la croissance cellulaire.

### I. Rôle de PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre

La souche CB15NΔ*pcoB*<sub>Cc</sub> présente une sensibilité accrue au cuivre. Cette souche complémentée par une copie de *pcoB*<sub>Cc</sub> en *trans* retrouve une résistance au CuSO<sub>4</sub> similaire à la souche sauvage, suggérant que PcoB<sub>Cc</sub> joue un rôle dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*.

Au cours de ce mémoire, la taille de PcoB<sub>Cc</sub> a été élucidée. En effet, sur base des expériences de complémentation, il s'avère que PcoB<sub>Cc</sub> équivaut à 32 kDa. Par contre, le *western blot* révèle une taille pour PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag estimée à 44 kDa. Deux hypothèses peuvent être formulées. Premièrement, la liaison d'atomes de cuivre aux protéines PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag pourrait entraver la migration. Ce type de perturbation a déjà été mis en évidence avec le zinc (communication personnelle du Professeur X. De Bolle). De manière à vérifier cette hypothèse, nous pourrions muter préférentiellement les domaines de liaison au cuivre de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag ou utiliser, dans les extraits protéiques, des chélateurs spécifiques du cuivre tels que la néocuproïne ou la cuprizone favorisant la forme non liée de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag. De plus, ces deux molécules ayant la particularité d'être spécifiques du cuivre Cu<sup>+</sup> ou Cu<sup>++</sup>, respectivement, leur utilisation serait un moyen de mettre en évidence la forme du cuivre (Cu<sup>+</sup> ou Cu<sup>++</sup>) liée par PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag.

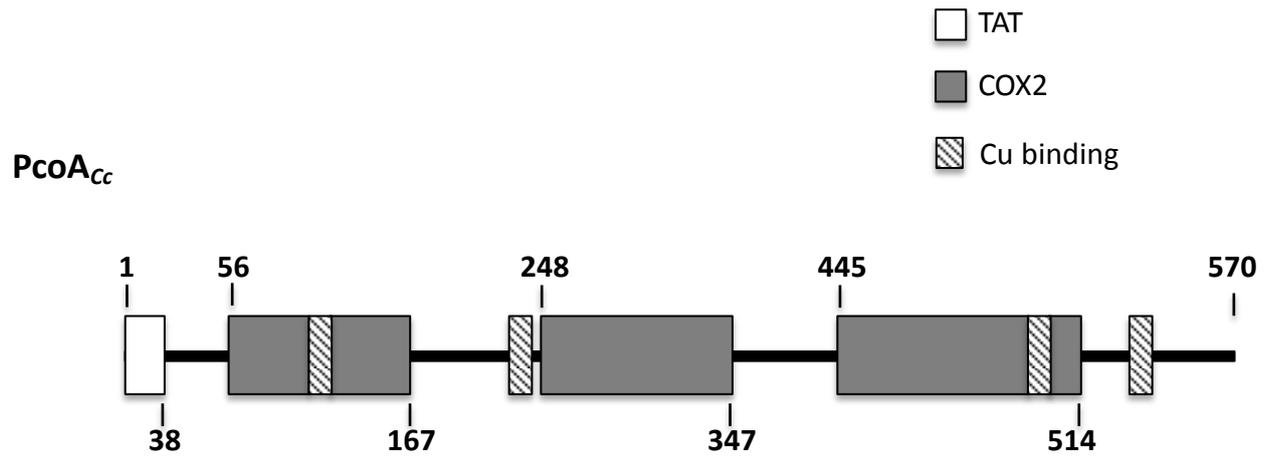


Figure 15. Schéma représentant le peptides signal Tat, les sites de liaisons du cuivre prédits et les domaines COX présents dans la protéine PcoA<sub>Cc</sub>. PcoA<sub>Cc</sub> contient 4 domaines de liaison au cuivre suggérant un rôle probable dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*.

La deuxième hypothèse est que le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) utilisé lors de la préparation d'échantillons protéiques serait à l'origine d'une altération de la migration. Des études montrent une relation entre l'index d'hydrophobie d'une protéine et la liaison du SDS (34). En effet, le SDS aurait tendance à s'agréger autour des sites hydrophobes de la protéine induisant une dénaturation « constructive » où les protéines adoptent une conformation avec un mélange d'hélices- $\alpha$  et d'enroulements aléatoires. Cette dénaturation « constructive » pourrait être à l'origine de la perturbation dans la migration de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag. Actuellement il n'existe aucune molécule pouvant remplacer le SDS, rendant difficile la vérification de cette hypothèse.

## II. Rôle de PcoA<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie du cuivre

PcoA<sub>Cc</sub> possède 4 domaines de liaison au cuivre prédits, supposant fortement son implication dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus* (Fig. 15). Pourtant, la complémentation de la souche CB15N $\Delta$ pcoA<sub>Cc</sub> n'est fonctionnelle que si les gènes pcoAB<sub>Cc</sub> sont exprimés en *trans*. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que PcoA<sub>Cc</sub> participe à l'homéostasie du cuivre de manière indirecte.

Premièrement, il est possible que pcoA<sub>Cc</sub> régule la transcription du gène pcoB<sub>Cc</sub>. La délétion de pcoA<sub>Cc</sub> aurait donc un effet polaire sur pcoB<sub>Cc</sub>. Pour vérifier cette hypothèse il est nécessaire d'obtenir des souches partiellement tronquées au niveau de pcoA<sub>Cc</sub>. La construction d'une souche, où 200 pb de pcoA<sub>Cc</sub> sont délétées, est en cours. Les 200 pb délétées sont localisées juste après le peptide signal Tat. Après mise au point de la qRT-PCR, la quantification de l'ARN correspondant à pcoB<sub>Cc</sub> dans les différentes souches partiellement tronquées permettrait de vérifier la présence ou non de régions régulatrices au sein de la séquence de pcoA<sub>Cc</sub>. La régulation de PcoA<sub>Cc</sub> sur PcoB<sub>Cc</sub> peut également intervenir au niveau post-transcriptionnel ou post-translationnel. Pour vérifier cela, un *western blot* comparant l'abondance de PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag dans les souches CB15N $\Delta$ pcoA<sub>Cc</sub> pcoB<sub>Cc</sub>::pcoB<sub>Cc</sub>-3Flag et CB15N pcoB<sub>Cc</sub>::pcoB<sub>Cc</sub>-3Flag est nécessaire.

Deuxièmement, il est possible que PcoA<sub>Cc</sub> soit un transporteur permettant à PcoB<sub>Cc</sub> de passer la membrane interne via la voie TAT. En effet, contrairement à PcoB<sub>Cc</sub>, PcoA<sub>Cc</sub> possède un peptide signal Tat. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de taguer les protéines d'intérêts et d'observer leur localisation (cytoplasme, membrane interne, périplasma, membrane externe) par centrifugation différentielle. Ceci permettrait de vérifier s'il y a une délocalisation de PcoA<sub>Cc</sub>/PcoB<sub>Cc</sub> dans les souches délétantes CB15N $\Delta$ pcoA<sub>Cc</sub> ou CB15N $\Delta$ pcoB<sub>Cc</sub>.

Il serait aussi intéressant de vérifier si les deux protéines interagissent ensemble en réalisant une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-His/3Flag ciblant respectivement PcoA<sub>Cc</sub>-His et PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag dans une souche CB15N pcoB<sub>Cc</sub>::pcoB<sub>Cc</sub>-3Flag pMR10ppcopcoA<sub>Cc</sub>-His.

| Protéines présentes chez <i>E. coli</i> | Homologues fonctionnels putatifs chez <i>C. crescentus</i> | Locus correspondant dans le génome de <i>C. crescentus</i> | <i>e-value</i>                             | Annotations   |
|---|--|--|--|---|
| CopA                                    | Oui  | <i>cc1407</i>  | $6,5e^{-89}$                               | Cation-transporting ATPase  |
| CueO                                    | Oui  | <i>cc0964</i>  | $1e^{-29}$                                 | Copper-binding protein  |
| CueR                                    | ?  | <i>cc3082</i><br><i>cc0081</i>                             | $1,5e^{-14}$<br>$1,6e^{-10}$               | Transcriptional regulator, MerR family  |
| CusA                                    | Oui  | <i>cc2390</i>  | $5,0e^{-158}$                              | Heavy metal efflux pomp, CzcA family  |
| CusB                                    | Oui  | <i>cc1203</i><br><i>cc2389</i><br><i>cc2722</i>            | $3,6e^{-10}$<br>$1,2e^{-7}$<br>$1,4e^{-7}$ | HlyD family secretion protein<br>Heavy metal efflux transporter, (RND family) |
| CusC                                    | Oui  | <i>cc0806</i>  | $9,1e^{-40}$                               | Efflux system protein   |
| CusF                                    | Non  | -  | -  | -   |
| CusR                                    | Oui  | <i>cc2757</i>  | $9,1e^{-40}$                               | DNA-binding response regulator  |
| CusS                                    | Oui  | <i>cc2755</i>  | $7,5e^{-22}$                               | Sensor histidine kinase   |
| PcoA                                    | Oui  | <i>cc0964</i>  | $3,4e^{-145}$                              | Copper-binding protein  |
| PcoB                                    | Oui  | <i>cc0965</i>  | $1,1e^{-33}$                               | Copper-binding protein, putative  |
| PcoC                                    | Non  | -  | -  | -   |
| PcoD                                    | Non  | -  | -  | -   |
| PcoE                                    | Non  | -  | -  | -   |
| PcoR                                    | Oui  | <i>cc2757</i>  | $1,2e^{-44}$                               | DNA-binding response regulator  |
| PcoS                                    | Oui  | <i>cc2755</i>  | $2,2e^{-19}$                               | Sensor histidine kinase   |

**Tableau 3. Séquences codantes présentes chez *C. crescentus* homologues aux protéines de résistance au cuivre chez *E. coli* (par meilleur alignement réciproque).** Pour chaque ORF, le locus correspondant, la *e-value* relative à l'alignement des séquences d'*E.coli* et de *C. crescentus* ainsi qu'une annotation fonctionnelle chez *C. crescentus* sont donnés.

De plus, la sensibilité accrue de *CB15NΔpcoB<sub>Cc</sub>* à un stress cuivré par rapport à la *CB15NΔpcoA<sub>Cc</sub>* conforte l'idée que *PcoA<sub>Cc</sub>* ne jouerait pas un rôle prépondérant dans l'homéostasie du cuivre. En se basant sur les nombreux homologues participants à la régulation du cuivre entre *C. crescentus* et *E. coli*, il est possible qu'un acteur secondaire provenant d'un autre système de détoxification assure le rôle de *PcoA<sub>Cc</sub>* lorsqu'elle est absente (Tab. 3) (14). La présence de plusieurs systèmes de détoxification expliquerait pourquoi il est nécessaire de travailler avec des concentrations en  $\text{CuSO}_4$  excessives par rapport aux concentrations réelles dans l'environnement.

### III. Perspectives afin de caractériser le rôle de *PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>*

Une perspective intéressante afin de caractériser *PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>* dans l'homéostasie du cuivre serait de localiser ces deux protéines chez *C. crescentus*. En plus d'une centrifugation différentielle, l'utilisation des souches *CB15NpcoA<sub>Cc</sub>::pcoA<sub>Cc</sub>-mCherry* et *CB15NpcoB<sub>Cc</sub>::pcoB<sub>Cc</sub>-meGFP* en microscopie à fluorescence permettrait également de localiser *PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>* (construction en cours).

L'utilisation de deux fluorochromes n'émettant pas dans la même longueur d'onde est primordiale pour vérifier s'il y a une co-localisation des protéines. Cependant, il est possible que l'utilisation du fluorochrome meGFP ne soit pas adaptée car le périplasma est un environnement oxydant, perturbant le repliement du fluorochrome et le rendant inactif. Si *PcoB<sub>Cc</sub>* s'avère être une protéine périplasmique, le signal sera donc perdu. Dans ce cas-ci, il faudra trouver un autre fluorochrome se repliant correctement dans le périplasma et n'émettant pas dans la même longueur d'onde que la mCherry. Un test de croissance sera aussi indispensable pour s'assurer que les fusions utilisées sont fonctionnelles.

Une mise au point de la qRT-PCR est nécessaire pour quantifier le taux d'ARNm des deux gènes d'intérêt dans les différentes souches et de mettre éventuellement en évidence une régulation transcriptionnelle de *pcoA<sub>Cc</sub>* sur *pcoB<sub>Cc</sub>*. L'utilisation d'un gène de contrôle autre que l'*ARNI6S<sub>Cc</sub>* est nécessaire puisque l'abondance de ce dernier semble être affectée par la présence du plasmide pMR10. En effet, les souches complémentées par le pMR10 nécessitent l'utilisation de kanamycine afin d'éviter la perte du plasmide. Cet antibiotique perturbe la traduction en liant la sous unité 30S du ribosome dont le constituant ARN est l'*ARNI6S*. Il est possible que la résistance liée au plasmide n'inhibe pas totalement la kanamycine. Le gène de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase), une enzyme de la glycolyse présente chez les eucaryotes et les procaryotes, peut potentiellement remplacer le gène contrôle *ARNI6S* (35).

Finalement, il serait intéressant de mesurer la concentration intracellulaire de cuivre par spectrométrie d'absorption atomique dans les souches délétantes *CB15NΔpcoA<sub>Cc</sub>* et *CB15NΔpcoB<sub>Cc</sub>*.



#### **IV. Autres candidats potentiels pour l'homéostasie du cuivre**

Le fait que la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB*<sub>Cc</sub> est capable de croître dans un milieu contenant 20 mg/l de CuSO<sub>4</sub> suppose la présence de plusieurs systèmes de détoxification chez *C. crescentus*. Il serait donc approprié de caractériser d'autres protéines prédites comme étant impliquées dans la résistance au cuivre. L'ensemble des protéines de *C. crescentus* homologues aux protéines de résistance au cuivre chez *E. coli* est répertorié dans le tableau 3. Il est intéressant de remarquer que l'ensemble des gènes codant pour des protéines appartenant au système Cus chez *E. coli* possède un homologue chez *C. crescentus*, excepté pour *cusF*<sub>Ec</sub>. Cette observation suggère fortement la présence d'un deuxième système de détoxification chez *C. crescentus*. Pour rappel, chez *E. coli*, le système Cus intervient dans des conditions extrêmes de stress cuivré, lorsque le principal système de détoxification (système Cue) est submergé (14).



# Matériel et méthodes



## I. Milieux

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

| Produits                         | Quantité (pour 1 L) |
|----------------------------------|---------------------|
| Hydrolysate de caséine (peptone) | 10 g                |
| NaCl                             | 5 g                 |
| Yeast extract                    | 5 g                 |
| Agar (pour milieu solide)        | 15 g                |

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

| Produits                  | Quantité (pour 1 L) |
|---------------------------|---------------------|
| Bactopeptone              | 2 g                 |
| Yeast extract             | 1 g                 |
| MgSO <sub>4</sub> 1M      | 1 ml                |
| CaCl <sub>2</sub> 1M      | 500 µl              |
| Agar (pour milieu solide) | 15 g                |

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

| Produits                 | Quantité (pour 500 ml) |
|--------------------------|------------------------|
| Imidazole 1M             | 2,5 ml                 |
| Hutner concentrated base | 10 ml                  |
| Glucose 10%              | 7,5 ml                 |
| Sodium Glutamate 20%     | 3,75 ml                |
| NH <sub>4</sub> Cl 1M    | 1 ml                   |
| Phosphate 0,1M           | 4,45 ml                |

Hutner concentrated base

| Produits   | Quantité (pour 1 L) |
|--|---------------------|
| Nitrilotriacetic acid  | 10 g                |
| MgSO <sub>4</sub>  | 14,45 g             |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O   | 3,335 g             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O 1mM | 748 µl              |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 100mM   | 3,56 ml             |
| Metal "44"   | 50 ml               |



## Métal "44"

| Produits  | Quantité (pour 1 L) |
|---|---------------------|
| Disodium EDTA   | 2,5 g               |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | 10,95 g             |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | 5 g                 |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                               | 1,54 g              |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O              | 0,248 g             |
| Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O | 0,177 g             |

**Rmq** : les milieux sont portés à volume avec de l'H<sub>2</sub>O désionisée.

## II. Antibiotiques et sucres

| Antibiotiques/sucres                                     | Solution de dissolution | Concentration stock |
|--|-------------------------|---------------------|
| Ampicilline (Amp)  | H <sub>2</sub> O        | 100 µg/µl           |
| Kanamycine (Kan)   | H <sub>2</sub> O        | 50 µg/µl            |
| Acide Nalidixique (Nal)                                  | NaOH 0,2 N              | 20 µg/µl            |
| Sucrose (Suc)  | H <sub>2</sub> O        | 30%                 |
| 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyrabinoside (X-Gal) | Diméthylformaldéhyde    | 40 µg/µl            |
| Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG)               | Ethanol 70 %            | 100 mM              |

**Rmq** : Les antibiotiques sont filtrés stérilement par un filtre 0,22 µm de porosité avant d'être aliquotés par volume de 1 ml.



### III. Souches bactériennes et techniques utilisées

#### a. Souches bactériennes, conditions de croissance, des plasmides et des lignées cellulaires

Les souches d'*E.coli* DH10B ou S17-1 ont été cultivées sur milieu LB solide ou liquide à 37 ° C. Les différentes souches de *C. crescentus* ont été cultivées sur un milieu PYE solide ou liquide ou dans un milieu HIGG à une concentration de cuivre connue (de 0 à 300 mg/L) et à 30 °C. Les antibiotiques utilisés pour cette étude sont: l'ampicilline, la kanamycine et l'acide nalidixique (concentrations décrites ci-dessous). Les plasmides utilisés pour les souches knock-out ou complémentées ont été, PKS-oriT (grande nombre copies), pMR10 (faible nombre de copies) et pNPTS138 (faible nombre de copies) (voir le tableau 1).

Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ):

| Antibiotics    | Boîte LB | LB liquid | Boîte PYE | PYE liquid |
|----------------|----------|-----------|-----------|------------|
| Ampicillin     | 100      | 50        | 50        | 5          |
| Kanamycin      | 50       | 30        | 20        | 5          |
| Nalidixic acid | 30       | 15        | 20        | 15         |

#### b. Polymerase Chain Reaction

- *PCR Diagnostique*: Le mélange de PCR était composé de dNTP (5 mM chacun), d'amorces spécifiques (10  $\mu\text{M}$  chacun), de lGoTaq polymérase (Promega®), de tampon 5X GoTaq et de l'ADN matrice (environ 70 ng) . Après une première étape de dénaturation pendant 4 min à 94°C, la PCR a été effectuée comme suit : 30 cycles segmentés par une première étape de dénaturation (30 s à 94°C, suivi d'une étape d'hybridation (30 s à une température appropriée en ce qui concerne les amorces prédit  $T_m$ ) et d'une étape d'élongation à 72°C (1 min/kb). Une étape d'allongement final a été effectuée pendant 10 min à 72°C. L'approximation de la taille des fragments et l'absence de produits d'amplification non spécifiques ont été vérifiés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium pour visualiser l'ADN en utilisant la lumière UV. L'étalon utilisé est le Ladder GeneRuler™ de 1kb (Fermenta).

- *PCR d'amplification* : Le mélange de PCR était composé de dNTP (2,5 mM chacun) , d'amorces spécifiques (10  $\mu\text{M}$  chacun) , Primestart (2,5 U/ $\mu\text{l}$  , TAKARA BIO INC , Otsu , Japon) , de Buffer Takara Haute GC (2X) et modèle ADN (environ 70 ng) . Avant l'initiation du programme de PCR, un mélange d'eau et de bactéries est porté à ébullition pendant 10 min afin de perméabiliser les membranes. Le programme PCR a été programmé pour 30 cycles d'amplification segmenté par première étape de dénaturation (10 s à 98°C), suivi d'une étape d'hybridation (30 s à une température appropriée à la  $T_m$  des amorces) et d'une étape d'élongation à 72°C (1 min/kb). L'estimation de la taille des fragments PCR et l'absence de produits d'amplification non spécifiques ont été vérifiés par migration d'électrophorèse (comme décrit précédemment pour la PCR diagnostique).



### c. Purification de produits PCR

La purification du produit PCR a été faite sur colonne en utilisant le MSB SpinPCRapace (Invitex, Berlin, Allemagne) et en suivant le protocole du fabricant.

### d. Protocole de ligation

La solution de ligation était constituée de vecteurs restreints, des séquences à insérer (les volumes utilisés sont en fonction des concentrations respectives de manière à obtenir un ratio 1/10), un tampon de ligase T4 5X et-ligase (Fermentas). Le mélange final a été incubé pendant une nuit à température ambiante.

### e. Transformation des souches *E. coli* DH10B CaCl<sub>2</sub>-compétente

Cent µl de cellules bactériennes compétentes ont été mis sur la glace et 10 µl d'ADN ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été incubé pendant 30 min sur la glace avant un choc thermique de 2 min à 42 °C. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans 1 ml de LB liquide et incubées 45 min à 37 °C. Ensuite, 100 µl de la culture ont été étalés sur du LB solide contenant les antibiotiques appropriés. Les 900 µl restants ont été centrifugés pendant 2 min à 8000 rpm. Le culot a été remis en suspension dans 100 µl de surnageant avant d'être étalés sur du LB solide contenant les antibiotiques appropriés. Enfin, les plaques ont été incubées pendant une nuit à 37 °C.

### f. Extraction des plasmides

Cinq ml d'*E. coli* (DH10B) cultivés pendant une nuit dans du LB liquide à 37 °C ont été centrifugés pendant 5 min à 12500 rpm. Le culot a été remis en suspension dans 300 µl de solution de P1 suivi par 300 µl de solution de lyse P2. Après 5 min, P2 a été neutralisé par une solution de P3 et le lysat a été centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. Le surnageant a été transféré dans une colonne de centrifugation et lavé avec 750 µl de tampon PE. Ensuite, le mélange a été centrifugé pendant 1 minute à 13000 rpm. Enfin, pour éluer l'ADN, 20 µl de ddH<sub>2</sub>O ont été ajoutés à la colonne et centrifugés pendant 1 minute à 13000 rpm. Extraction de plasmide a été faite en utilisant le QIAprep® Spin Miniprep Kit (250).

*Solution pour minipréparation :*

| <b>P1</b>              | <b>P2</b>          | <b>P3</b>                         |
|------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| <b>Tris 50 mM</b>      | <b>NaOH 200 mM</b> | <b>acétate de potassium 2,8 M</b> |
| <b>EDTA 10 mM</b>      | <b>SDS 1%</b>      |                                   |
| <b>Rnase A 5g</b>      |                    |                                   |
| <b>Mettre à pH 8,0</b> |                    | <b>Mettre à pH 5,4</b>            |



### **g. Restriction enzymatique**

L'ADN a été incubé pendant 1 h à 2 h (en fonction de la quantité d'ADN) à 37 °C avec l'enzyme(s) de restriction appropriée(s) et le tampon approprié.

| <b>Produits</b>                 | <b>quantité</b> |
|---------------------------------|-----------------|
| <b>ADN</b>                      | 5-10 µl         |
| <b>Tampon</b>                   | 2 µl            |
| <b>Enzyme(s) de restriction</b> | 1 µl/enzyme     |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>           | X µl            |

Volume final : 20 µl

### **h. Conjugaison**

Cinquante µl d'une culture d'*E.coli* S17- 1 compétente portant le plasmide d'intérêt ont été mélangés avec 1 ml de la culture de *C. crescentus*. Le mélange a ensuite été centrifugé pendant 3 min à 6000 rpm. Le surnageant a été jeté et le culot a été remis en suspension dans 1 ml de PYE liquide et centrifugé à nouveau pendant 3 min à 6000 rpm. Le culot obtenu a été remis en suspension dans une petite fraction du surnageant avant d'être réparties en une seule goutte sur du PYE solide et incubé une nuit à 30 °C.

Pour les plasmides intégratifs (par exemple pNPTS138), la moitié de la goutte aura été prélevée et étalée sur du PYE solide additionné de kanamycine et d'acide nalidixique avant d'être incubée pendant 3 jours à 30 °C. Ensuite, l'une des colonies a été incubée pendant 24 h dans du PYE liquide sans antibiotique afin de permettre aux bactéries de perdre le plasmide intégré. 100 µl de cette culture ont ensuite été étalés sur du PYE solide contenant du saccharose (3%). Les clones se développant sur ce milieu sont enfin étalés sur du PYE solide additionné de kanamycine et sur du PYE solide additionné de saccharose. Seul les clones ayant poussés uniquement sur du PYE solide mélangé au saccharose ont été sélectionnés pour une PCR diagnostique

### **i. Bioscreen**

Après une nuit d'incubation, les cultures de *C. crescentus* (à un  $DO_{595nm}$  de 0,06) ont été mélangées avec une solution de  $CuSO_4$  à différentes concentrations dans une plaque de culture 96 puits (CELLSTAR ®). Par le biais d'un spectrophotomètre relié au programme Gen5, la densité optique ( $595_{nm}$ ) a été mesurée toutes les 15 min pendant 24 h à 30 °C sous agitation continue. Les courbes de croissance peuvent être établies à partir de la feuille de calcul de données générées



## j. Western Blot

À partir d'une culture "over night", les cellules ont été lysées dans un tampon de charge. Les échantillons ont été bouillis pendant 10 min et 10 µl ont été chargés sur un gel SDS-PAGE. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ensuite, la membrane a été saturée pendant 1 h avec du PBST contenant 5% de lait, puis incubée pendant 1 h avec un anticorps primaire correspondant au tag utilisé (3F ou His). Un deuxième anticorps couplé à une peroxydase et spécifique à l'anticorps primaire est nécessaire pour révéler la présence de protéines d'intérêt.

*Produits utilisés :*

| <b>PBS 10x (1L)</b>                         | <b>PBS tween (1L)</b> | <b>SDS Page Tris-Glycine 10x (1L)</b> | <b>Towbin Buffer (L)</b> |
|---|-----------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| <b>NaCl</b> 82 g                            | <b>PBS 10x</b> 100 ml | <b>Tris Base</b> 30,35 g              | <b>Tris Base</b> 5,8 g   |
| <b>KCl</b> 1,5 g                            | <b>Tween</b> 500 µl   | <b>Glycine</b> 144 g                  | <b>Glycine</b> 2,8 g     |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> 14,2 g |                       | <b>SDS</b> 10 g                       | <b>SDS</b> 0,37 g        |
| <b>KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> 2,72 g |                       |                                       | <b>Méthanol</b> 200 ml   |

*Tampon de charge :*

| <b>Produits</b>                  |
|----------------------------------|
| <b>SDS</b> 4%                    |
| <b>Mercaptoéthanol</b> 10%       |
| <b>Bleu de bromophénol</b> 0,05g |
| <b>Glycérol</b> 20%              |
| <b>Tris-HCL pH6,8</b> 0,12M      |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>            |

**Rmq :** Les solutions et le tampon de charge sont portées à volume avec de l'H<sub>2</sub>O désionisée.

*Compositions des gels :*

| <b>Produits</b>          | <b>Running gel (20 ml)</b> | <b>Stacking gel (6 ml)</b> |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b>    | 8,4 ml                     | 3,6 ml                     |
| <b>Acrylamide</b> 38,5 % | 6,2 ml                     | 0,78 ml                    |
| <b>Tris pH 8,8</b> 1,5 M | 5 ml                       | x                          |
| <b>Tris pH 6,8</b> 1,5 M | x                          | 1,5 ml                     |
| <b>SDS</b> 10 %          | 0,2 ml                     | 0,06 ml                    |
| <b>APS</b> 10 %          | 0,2 ml                     | 0,06 ml                    |
| <b>TEMED</b>             | 0,016 ml                   | 0,006 ml                   |



## **k. Spectrométrie d'absorption atomique**

Cinq ml de culture « over night » de *Caulobacter crescentus* ont été centrifugés pendant 30 min à 10000 rpm. Avant d'enlever le supernageant et de resuspendre le culot dans 5 ml de PFA 2%, 2 ml ont été prélevés afin de mesurer la quantité de cuivre avant les lavages.

Après 20 min à température ambiante, la culture a été centrifugée pendant 10 min à 10 000 rpm. Le surnageant a été enlevé puis le culot a été resuspendu dans 10 ml de *Ice cold wash buffer*. Afin de laver correctement les cellules et d'enlever le maximum de cuivre, 3 centrifugations suivies chacune par une resuspension du culot dans 10 ml de *Ice cold wash buffer* ont été réalisées. Avant la dernière centrifugation, 100 µl du supernageant ont été prélevés et mélangés dans 900 µl d'éthanol 77% pour le comptage des cellules par microscopie.

Après la dernière centrifugation, 2 ml du supernageant ont été prélevés afin de vérifier si le lavage a été correctement réalisé. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 2 ml de HNO<sub>3</sub>. Finalement, les cellules sont lysées par sonication pendant 16 min suivi de 10 cycles de *phase prep* de 30 s.

La concentration en cuivre des différents échantillons est mesurée grâce à un spectromètre d'absorption atomique. Cette technique se base sur la loi de Beer-Lambert appliquée à l'absorption des atomes à l'état fondamentale. L'instrument se divise en 4 parties : Une lampe à cathode creuse, un brûleur, un monochromateur et un détecteur. En vaporisant les échantillons dans le brûleur, le rayonnement polychromatique de la lampe est modifié par l'absorption des atomes. Le monochromateur permet la sélection de la longueur d'onde correspondant à l'atome étudié (ici le cuivre). Le détecteur, qui est associé à un ordinateur, permet l'amplification, le traitement et l'affichage du signal reçu.

*Produits utilisés :*

| <b>Produits</b>             |
|-----------------------------|
| <b>PFA 2%</b>               |
| <b>Ice cold wash buffer</b> |
| <b>HNO<sub>3</sub> 1M</b>   |

*Ice cold wash buffer :*

| <b>Produits</b> | <b>Concentration finale</b> |
|-----------------|-----------------------------|
| <b>Tris Hcl</b> | 1mM                         |
| <b>EDTA</b>     | 100µM                       |
| Mettre à pH 7,0 |                             |



## 1. qRT-PCR

### 1. Extraction ADN/ARN

Dix ml de culture « over-night » (à une  $DO_{595nm}$  de 0,8) ont été centrifugés 10 min à 5000 rpm. Le culot a été ensuite resuspendu dans 1 ml de *TriPure Isolation Reagent* afin de lyser les cellules. Après 5 min à température ambiante, 200  $\mu$ l de chloroforme ont été ajoutés. La solution a été ensuite mélangée pendant 15 s et laissée incuber 10 min à température ambiante.

Après une centrifugation de 15 min à 12000 g, 3 couches distinctes ont été obtenues : une couche supérieure incolore contenant l'ADN et l'ARN, une petite interphase blanche contenant les débris cellulaires et une couche inférieure rouge contenant le *TriPure Isolation Reagent*.

La couche supérieure est prélevée et mélangée à 500  $\mu$ l d'isopropanol dans un nouvel eppendorf. Après une incubation « over night » à  $-20^{\circ}C$ , l'échantillon a été centrifugé 10 min à 12000g puis le supernatant a été éliminé et 1 ml d'éthanol 75% a été ajouté pour laver le culot. L'échantillon a été ensuite centrifugé 5 min à 7500g puis le culot a été séché 15 min à température ambiante. Finalement, le culot a été resuspendu dans 20  $\mu$ l d' $H_2O$  DEPC avant d'être incubé pendant 10 min à  $58^{\circ}C$ .

### 2. Traitement à la DNase

Sept  $\mu$ g d'ADN/ARN ont été mélangés à 1  $\mu$ l de DnaseI et 1  $\mu$ l de tampon de réaction  $MgCl_2$ . La mise à niveau (20 $\mu$ l) se fait avec de l' $H_2O$  DEPC. Après une incubation de 30 min à  $37^{\circ}C$ , 1 $\mu$ l d'EDTA a été ajouté. L'échantillon est ensuite incubé 10 minutes à  $65^{\circ}C$ .

### 3. Rétro-transcription

Deux  $\mu$ g d'ARN/ech. sont dilués dans 7,5  $\mu$ l d' $H_2O$  DEPC avant d'être mélangés à 2 $\mu$ l d'oligo dT. 9  $\mu$ l du mix sont ajoutés après une incubation de 10 min à  $70^{\circ}C$  et 5 min sur glace. Après l'ajout de 1,5  $\mu$ l de superscript, l'échantillon a été incubé pendant 1h30 à  $42^{\circ}C$  suivi d'une incubation de 15 min à  $70^{\circ}C$ . Avant d'être congelé à  $-20^{\circ}C$ , 1 $\mu$ l d'ARNaseH et 20 min d'incubation à  $37^{\circ}C$  aura permis de digérer l'ARN restant.

### 4. PCR

Dans une plaque 96 puits (AB Applied Biosystems), l'ADN<sub>c</sub> de chaque échantillon a été mélangé avec du « power SYBR® Green PCR Master Mix » (AB applied Biosystems), de l' $H_2O$  DEPC et avec le couple d'amorces correspondant au gène étudié. Grâce à un thermocycler relié au programme « StepOne », la force du signal émis par le SYBR Green est mesurée et retranscrite sur un graphique.

**Rmq** : Toutes les centrifugations ont été réalisées à  $4^{\circ}C$ .

Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions RNase-free



*Produits utilisés :*

| <b>Produits</b>                            |
|--|
| <b>TriPure Isolation Reagent</b>           |
| <b>Chloroforme</b>                         |
| <b>Isopropanol</b>                         |
| <b>Tampon de réaction MgCl<sub>2</sub></b> |
| <b>DNase I</b>                             |
| <b>H<sub>2</sub>O DEPC</b>                 |
| <b>Ethanol 75%</b>                         |
| <b>EDTA 25mM</b>                           |
| <b>Oligo dT 500ng/μl</b>                   |
| <b>Super script II 20U/μl</b>              |

*Mix :*

| <b>Produits</b>            | <b>Quantité</b> |
|----------------------------|-----------------|
| <b>BUFFER RT 5x</b>        | 4 μl            |
| <b>DTT 0,1M</b>            | 2 μl            |
| <b>RNasin 40U/ μl</b>      | 1 μl            |
| <b>dNTP mix</b>            | 1 μl            |
| <b>H<sub>2</sub>O DEPC</b> | 1 μl            |



## IV. Table des plasmides et des amorces

Table 1 - Plasmides

| Plasmides  | Descriptions  | Références                    |
|------------|---|-------------------------------|
| pMR10kan   | Vecteur répliatif à faible copie portant un gène de résistance à la kanamycine et le gène d'intérêt à intégrer. | Hall <i>et al.</i> , 1983     |
| pNPTS138   | Plasmide intégratif portant un gène de résistance à la kanamycine.  | Dickon., 1994                 |
| pSKoriTamp | Plasmide intégratif portant un gène de résistance à l'ampicilline.  | Tibor A.,<br>Data non publiés |

Table 2- Amorces utilisées pour la construction des souches knock-out.

| souches  | Amorces                | Sites de restriction | Séquences                         |
|--|------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| CB15N $\Delta$ pcoA <sub>Cc</sub><br>(PcoB <sub>Cc</sub> = 32kDa)  | 1 – Sens amont         | EcoRI                | CGgaattcCGCAGCGCTACTCCGCCACGAT    |
|  | 2 – Anti-sens amont    | XbaI                 | GCtctagaGCCTTGGGTATCACGCGAGCCA    |
|  | 3 – Sens aval          | XbaI                 | GCtctagaGCAGCCCGGCGACTGGGCCTTC    |
|  | 4 – Anti-sens amontval | HindIII              | CCCaaagcttGGGGGCCTTCAGGCCCTCCAGCT |
| CB15N $\Delta$ pcoA <sub>Cc</sub><br>(PcoB <sub>Cc</sub> = 32 kDa) | 1 – Sens amont         | EcoRI                | CGgaattcCGCAGCGCTACTCCGCCACGAT    |
|  | 2 – Anti-sens amont    | XbaI                 | GCtctagaGCCTTGGGTATCACGCGAGCCA    |
|  | 3 – Sens aval          | XbaI                 | GCtctagaTGACCTATGCGGACCTCGCC      |
|  | 4 – Anti-sens aval     | HindIII              | CCCaaagcttCCGCCGCTGGGGCGCGGGC     |
| CB15N $\Delta$ pcoB <sub>Cc</sub>                                  | 1 – Sens amont         | EcoRI                | CGgaattcCGCTCTATCCGCCCAAGGAC      |
|  | 2 – Anti-sens amont    | XbaI                 | GCtctagaGCCCTGTGATGGGCGTGCGG      |
|  | 3 – Sens aval          | XbaI                 | GCtctagaATGTGCGCGTGGTGCGCGAG      |
|  | 4 – Anti-sens aval     | HindIII              | CCCaaagcttAGCTGCGCGAAGGTCTGCTC    |
| CB15N $\Delta$ pcoAB <sub>Cc</sub>                                 | 1 – Sens amont         | EcoRI                | CGgaattcCGCAGCGCTACTCCGCCACGAT    |
|  | 2 – Anti-sens amont    | XbaI                 | GCtctagaGCCTTGGGTATCACGCGAGCCA    |
|  | 3 – Sens aval          | XbaI                 | GCtctagaATGTGCGCGTGGTGCGCGAG      |
|  | 4 – Anti-sens aval     | HindIII              | CCCaaagcttAGCTGCGCGAAGGTCTGCTC    |



Table 3- Amorces utilisées pour la construction des souches complémentées.

| Gène amplifiés                          | Amorces       | Sites de restriction | Sequences  |
|---|---------------|----------------------|--|
| <i>ppcopcoA<sub>Cc</sub></i>            | amont<br>aval | SpeI<br>SacI         | GGactagtCAGCGCTACTCCGCCACGAT<br>CgagctcTCACGCGGCGGCTCCATCGA  |
| <i>ppco<sub>Cc</sub></i>                | amont<br>aval | EcoRI<br>NcoI        | CATGccatggACGAGCCCGGCGACTGGGCC<br>GGactagtCTACCGCCAGGCGCTGACGC   |
| <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> (900 bp)       | amont<br>aval | NcoI<br>SpeI         | GGactagtCTACCGCCAGGCGCTGACGC<br>GGactagtCTACCGCCAGGCGCTGACGC   |
| <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> (1200 bp)      | amont<br>aval | NcoI<br>SpeI         | CATGccatggGACCTATGCGGACCTCGCCA<br>GGactagtCTACCGCCAGGCGCTGACGC   |
| <i>pcoB<sub>Cc</sub></i> -3Flag (900bp) | amont<br>aval | NcoI<br>SpeI         | GGactagtCTACCGCCAGGCGCTGACGC<br>GGACTAGTCTActgtcatcgtcatccttgaatc gatgcatgatctt<br>tataatcacgcatggtctttgtagtcCCGCCAGGCGCTGACG<br>C |

Table 4 - amorces utilisées pour la qRT-PCR

| Gène amplifiés             | Amorces       | Sequences                                    |
|----------------------------|---------------|--|
| <i>pcoA<sub>Cc</sub></i>   | amont<br>aval | CTATCTGATGAACGGCCACG<br>GATGCGGACGTTGAAGATGG |
| <i>pcoB<sub>Cc</sub></i>   | amont<br>aval | TCCTATGATCTGCGCCTGAC<br>ACTGCGGCTTGATCTCGTAG |
| <i>ARN16S<sub>Cc</sub></i> | amont<br>aval | TGAAAGCCCAGGGCTCAACC<br>TATGTCGCCTTCGCCACTGG |



## Références

- (1) Ruokolainen, L., Lindén, A., Kaitala, V., et Fowler, M. S. 2009. "Ecological and evolutionary dynamics under coloured environmental variation." *Trends in Ecology & Evolution*. 24, 556-563.
- (2) Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Caccamo, D., et Strackebandt, E. 2003. "bacillus aeolius sp.Nov. A novel thermophilic, halophilic marine bacillus species from Eolian Island (Italy)." *Systematic and Applied Micro*. 26, 172-176
- (3) Stróżecka, J. et al. 2012. "Importance of N- and C-terminal Regions of IbpA, Escherichia coli Small Heat Shock Protein, fir Chaperone Function and Oligomerization." *J. Biol. Chem*. 287, 2843-2853
- (4) Campbell
- (5) Baize, D. 1997. "Teneurs totales en éléments trace métalliques dans les sols." *Rapport de l'institut national d'agronomies de Paris*. 3190-3199.
- (6) Juste, C. 1988. "Appreciation de la mobilité et de la disponibilité des éléments en traces du sol." *science du sol*. 23, 103-112.
- (7) Godin, P. 2010. "Les sources de pollution des sols : Essai de quantification des risques dus aux éléments traces." *Association française pour l'étude des sols*. 73-86.
- (8) Suzuki, M., H. 2013. "Bone health in patients with anorexia nervosa". *Clin Calcium*. 23, 263-269.
- (9) Sheftel, A. 2012. "The long History of Iron in the Universe and in Health and Disease." *Bio. Biophys. Acta*. 1820, 161-187.
- (10) Gruber, K., Maywald, M., Rosenkranz, E., Haase, H., Plumakers, B., and Rink, L. 2013. "Zinc deficiency adversely influences interleukine-4 and interleukine-6 signaling." *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 27, 667-671.
- (11) Pichard, A., et al. 2005. "Cuivres et dérivés." *INERIS*.
- (12) Johnson, M. D., Larry E. (2008). "Copper." *Merck Manual Home Health Handbook*. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co.
- (13) Dulski T. R. 1996. "A manual for the chemical analysis of metals " *ASTM International*, vol. 25, 75
- (14) Osman, D., Cavet, J. 2008. "Copper homeostasis in bacteria". *Advances in Applied Microbiology*. 65, 217-244
- (15) Rensing C., Grass G. 2003. "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment." *FEMS microbiology Reviews*. 27, 197-213
- (16) Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J., et O'Halloran, T. V. 2001. "Rhe independent cue and cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in escherichia coli." *J. Biol. Chem*. 276, 30670-30677.
- (17) Stoyanov, J. V., Hobman, J. L., et Brown, L. N. 2001. "CueR (Ybb1) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA." *Molecular Microbiology*. 39, 502-512.



- (18) Grass, G., and Rensing, C. 2001. " CueO is a multicopper oxidase that confers copper tolerance in escherichia coli." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 902
- (19) Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., et Rosen, B. P. 2000. "CopA : an escherichia coli Cu(i) translocating P type ATPase." *PNAS.* **97**, 652-656.
- (20) Franke, S., Grass, G., et Nies, D.H. (2001). "The product of the IybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions." *Microbiology.* **147**, 965-972
- (21) Munson, G. P., Lam, D. L., et O'Halloran T. V. 2000. "Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12." *J. Bacteriology.* **182**, 5864-5871.
- (22) Checa, S. K., Espariz, M., Audero, M. E. P., Botta, P. E., Spinelli, S. V., et Soncini, F. C. 2007. "Bacterial sensing of and resistance to gold salt". *Mol. Microbiology.* **63**, 1307-1318
- (23) Solioz, M., Abicht, H.K., Mermoud, M., et Mancini, S. 2010. "Response of gram-positive bacteria to copper stress". *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 3-14.
- (24) Errington, J. 2003. "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*". *Nat. Rev. Microbi.* **1**, 117-126.
- (25) Ueda, K., Tomaru, Y., Endoh, K., et Beppu, T. 1997. « Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*." *J. Antibiot.* **50**, 693-695.
- (26) Skerker, M., et Laub, M. 2004. "Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*." *Nature Review Microbiology.* **2**, 352-337
- (27) England, J. C., Perchuk, B. S., et Gober, J. W. 2010. "Global Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation in *Caulobacter crescentus* in Response to Nutrient Availability." *J. Bacteriol.* **192**, 819-833.
- (28) Hu, P., Brodie, E. L., Suzuki, Y., McAdams, H. H., et Andersen, G. L. 2005. "Whole-Genome Transcriptional Analysis of Heavy Metal Stresses in *Caulobacter crescentus*." *J. Bacteriol.* **24**, 8437-8449.
- (29) Da Silva Neto, J. F., Braz, V. S., et Marques M. V. 2009. « Fur control iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*." *Nuclei Acide Res.* **14**, 48112-4825.
- (30) Fang, G. et al. 2013. "Transcriptomic and phylogenetic analysis of a bacterial cell cycle reveals strong associations between gene co-expression and evolution." *BMC Genomics.* **14**, 450.
- (31) Andersen, G. Menkissoglu, O. et Lindow, S. 1991. "Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California." *Physiopathology.*
- (32) Gupta, S. D., Lee, B. T., Camakaris, J. et Wu, H. C. "Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*." *Journal of bacteriology.* **177**, 4207-4275



- (33) Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., et Deber, C. M. 2008. "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins". *PNAS*. **106**: 1760-1765.
- (34) Riley, R., G. Kolodziej, B., J. 1976. "Pathway of glucose catabolism in *Caulobacter crescentus*". *Microbios*. **16**, 219-226
- (35) Wu, Y. Wu, M. He, G. Zhang, X. Li, W. Gao, Y. Li, Z. Wang, Z. Zhang, C. 2012. "Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase: a universal internal control for Western blots prokaryotic and eukaryotic cells". *Anal. Biochem*. **423**, 15-22.