



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### L'impact du cuivre sur le cycle cellulaire bactérien et le rôle des gènes *pcoACc* et *pcoBCc* dans la résistance au cuivre chez *Caulobacter crescentus*

Gillet, Sébastien

*Award date:*  
2013

*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.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**L'IMPACT DU CUIVRE SUR LE CYCLE CELLULAIRE BACTÉRIEN ET LE RÔLE  
DES GÈNES *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* DANS LA RÉSISTANCE AU CUIVRE CHEZ  
*CAULOBACTER CRESCENTUS***

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

Sébastien GILLET

Janvier 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@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **L'impact du cuivre sur le cycle cellulaire bactérien et le rôle des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* dans la résistance au cuivre chez *Caulobacter crescentus***

GILLET Sébastien

### Résumé :

Tous les organismes vivent en constante interaction avec leur milieu. S'adapter pour survivre et se reproduire est une clé de l'évolution. *Caulobacter crescentus*, une alphaprotéobactérie aquatique oligotrophe, n'échappe pas à cette règle et doit faire face aux différents stress présents dans son environnement, souvent pollué ou inhospitalier.

Cette bactérie au cycle cellulaire bien caractérisé, générant une forme cellulaire flagellée et une autre pédonculée, est un modèle idéal pour l'étude des processus associés au cycle cellulaire. L'objectif de ce travail est de déterminer si un stress environnemental tel que l'excès de cuivre peut avoir un impact sur le cycle cellulaire bactérien. Par la caractérisation de l'action de deux gènes (*PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>*), ce mémoire va essayer d'apporter des pistes de réponse à cette question.

Des souches mutées pour ces gènes ont été caractérisées et présentent une sensibilité accrue au cuivre. Ces souches montrent également des aberrations morphologiques lorsqu'elles sont placées en présence d'un stress au cuivre ainsi qu'une accumulation de cellules prédivisionnelles, possible signe d'un blocage au cours du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'abondance de *PcoB<sub>Cc</sub>*-3Flag varie au cours du cycle cellulaire.

Une hypothèse principale est proposée pour expliquer ces observations. Les stress oxydatifs générés par le cuivre ont des effets délétères sur les bactéries, et les dégâts engendrés causeraient cette accumulation de cellules prédivisionnelles et ces problèmes morphologiques. L'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>* serait très important pour les cellules sessiles, puisqu'elles ne peuvent fuir le stress au cuivre.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2013

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



# Remerciements

Tout d'abord, il est évident que mes premiers remerciements vont à Jean-Yves Matroule, Jean-Jacques Letesson et Xavier De Bolle, pour leur accueil au sein de l'URBM et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans leurs laboratoires. J'aimerais naturellement mettre une emphase particulière sur les remerciements destinés à mon promoteur, Jean-Yves Matroule, pour son encadrement tout au long de ce mémoire, pour la patience dont il a fait preuve, et pour ses conseils avisés.

J'aimerais également remercier ma doctorante, Emeline Lawarée, pour sa motivation (qui semble ne pas avoir de limites, ce qui est aussi bien une bénédiction qu'une malédiction pour ses mémorants), pour sa patience sans faille et son encadrement. Je remercie également le reste de la team B.E.A.R.; Lio (un jour tu tabasseras un mémorant, ne t'en fais pas) et Françoise. Sans oublier Jérôme, bien entendu, qui, à force de squatter la zone, est un peu comme un membre de la Team.

Je remercie aussi tous les gens de l'URBM pour leur gentillesse et la bonne ambiance qui régnait au labo (merci Mike pour les belles chansons que tu dispenses tout au long de la journée, Mich-Mich pour ton entrain, et Thib', notamment pour avoir canalisé Hubert pendant un an, ce qui doit être dur quand même). Gautier, J-F, Hubert : et bien, j'aurais probablement perdu toute santé mentale si je n'avais pas pu compter sur vous pour traverser ce mémoire. *Through Hell and back again*, avec "The car song" dans les oreilles.

Il va sans dire que je remercie ma famille et mes proches pour leurs encouragements et leur support, et pour m'avoir notamment permis de faire ce que j'aime.

Et enfin, je remercie mes lecteurs pour tout le temps qu'ils consacreront à la lecture de ce mémoire. J'espère quand même que vous prendrez moins de temps à le lire que je n'en ai mis à l'écrire, et que le sujet vous aura semblé aussi intéressant qu'à moi.

Bonne lecture à tous.





*"Science never solves a problem without creating ten more.  
And that's what is beautiful about it"*

*– George Bernard Shaw*

*"I'll be there where fire makes you dance"*

*– Ronnie James Dio*



# Table des matières

Introduction .....	3
I) L'environnement et son impact sur le vivant.....	3
a. Introduction générale.....	3
i. Les organismes s'adaptent constamment aux variations de l'environnement .....	3
b. L'importance de l'homéostasie face aux différents stress du milieu.....	3
II) L'importance des oligo-éléments.....	5
a. Définitions et concepts, notion d'éléments-traces métalliques et d'oligo-éléments.....	5
b. Exemples d'oligo-éléments et leurs fonctions .....	7
III) Le cuivre et son importance dans les processus biologiques.....	7
a. Généralités.....	7
i. Propriétés physico-chimiques.....	7
ii. Les sources de cuivre dans l'environnement .....	7
iii. Concentrations normales et en milieux pollués.....	9
b. Homéostasie du cuivre chez les bactéries.....	9
i. Le cuivre : un oligo-élément à double tranchant .....	9
ii. Mise en place de systèmes actifs pour contrôler la concentration en cuivre .....	11
1. Les systèmes de régulation chez <i>E. coli</i> .....	11
2. La régulation du cuivre chez d'autres espèces bactériennes .....	15
c. Le cuivre perturbe le cycle cellulaire de plusieurs bactéries .....	15
III) <i>Caulobacter crescentus</i> : Un modèle d'étude idéal .....	17
a. Généralités.....	17
b. La division asymétrique .....	17
i. Le cycle cellulaire particulier de <i>C. crescentus</i> .....	17
ii. Impacts des facteurs environnementaux sur le cycle cellulaire.....	19
c. <i>C. crescentus</i> – Une faculté de colonisation hors-norme, même dans les milieux contaminés	
21	
Objectifs du mémoire .....	21
Résultats .....	25
1) Caractérisation de la sensibilité au cuivre chez <i>C. crescentus</i> .....	25
A. La résistance au cuivre chez <i>C. crescentus</i> .....	25
B. Analyse morphologique de la souche sauvage lors de stress au cuivre.....	27
C. Le cuivre, aux doses testées, ne semble pas entraîner de mort cellulaire.....	29



2)	Des homologues de systèmes de régulation du cuivre d' <i>E. coli</i> sont présents chez <i>C. crescentus</i>	31
3)	Constructions de souches délétantes et marquées au locus .....	33
4)	La souche double délétante CB15N $\Delta$ <i>pcoAB</i> <sub>Cc</sub> montre une sensibilité au cuivre accrue .....	37
	A. Une résistance au cuivre diminuée .....	37
	A. Une accumulation de cellules prédivisionnelles lors d'un stress au cuivre .....	39
	B. Analyse du contenu en ADN par cytométrie de flux.....	41
5)	L'abondance protéique de PcoB <sub>Cc</sub> 3Flag varie au cours du cycle cellulaire.....	43
	Discussions et perspectives .....	49
1)	<i>pcoA</i> <sub>Cc</sub> et <i>pcoB</i> <sub>Cc</sub> , acteurs d'une homéostasie fine et efficace du cuivre .....	49
2)	Fonctions de PcoA <sub>Cc</sub> et PcoB <sub>Cc</sub> et hypothèses.....	49
3)	Effets du cuivre sur le cycle cellulaire et la morphologie .....	51
	A. Le cuivre entraîne une accumulation de cellule prédivisionnelles.....	51
	B. Le cuivre affecte la morphologie de la cellule .....	53
4.	Matériels et méthodes.....	59
I.	Souches et plasmides.....	59
II.	Milieus, tampons et solutions.....	61
	A. Milieu .....	61
	B. Antibiotiques et sucres .....	63
	C. Tampons et solutions.....	63
5	Techniques relatives aux bactéries .....	65
	A. Transformation bactérienne par choc thermique .....	65
	1. Principe.....	65
	2. Méthode.....	65
	B. Electroporation .....	67
	1. Principe.....	67
	2. Méthode.....	67
	C. Tests de caractérisation des mutants.....	69
	1. Courbe de croissance.....	69
6	Techniques relatives aux acides nucléiques .....	69
	A. Polymerase chain reaction (PCR).....	69
	B. Minipréparation .....	73
	C. Electrophorèse en gel d'agarose .....	75
	D. Purification sur gel .....	77
	E. Purification sur colonne.....	79
	F. Restriction de plasmide .....	79



7	Technique relative aux protéines.....	79
i.	Préparation d'extraits protéiques en conditions dénaturantes .....	79
ii.	Immunodétection de protéines par Western Blot .....	81
iii.	Synchronisation .....	83







# **Introduction**



## Introduction

### I) L'environnement et son impact sur le vivant

#### a. Introduction générale

L'environnement se définit par les paramètres biotiques ou abiotiques qui composent le milieu, tels la température, le pH, l'osmolarité ou encore la disponibilité en nutriments. Ces paramètres étant variables, l'organisme vivant doit pouvoir s'adapter à ces changements afin de survivre.

#### *i. Les organismes s'adaptent constamment aux variations de l'environnement*

L'interaction de l'organisme avec son environnement tend à favoriser le processus évolutif et l'adaptation de cet organisme. En effet, la colonisation d'une niche écologique, quelles que soient les conditions environnementales, se fait au prix de compromis évolutifs. Chaque organisme possède donc des seuils de tolérances différents. Ainsi, la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* possède un optimum de croissance à 70°C alors que celui d'*Escherichia coli* est situé à 37°C [1]. Certaines sulfobactéries, archéobactéries acidophiles, peuvent s'installer dans des environnements à pH 2 alors que ce type de milieu serait hostile au développement d'une bactérie comme *Caulobacter crescentus* [2].

Cependant, tout organisme vivant possède une « valence écologique » lui permettant de tolérer des variations de certains paramètres de l'environnement [3]. En effet, les paramètres biotiques ou abiotiques de l'environnement ne sont pas toujours constants et peuvent varier au cours du temps. Par exemple, le courant d'une rivière peut entraîner des fluctuations dans l'apport en nutriments, charrier des composés toxiques, ou encore faire varier le pH du milieu. Les organismes doivent donc être capables de s'acclimater à des perturbations légères et passagères du milieu. Cependant, cette capacité "passive" de valence écologique n'est pas toujours suffisante. Un paramètre du milieu peut par exemple s'écarter de manière importante de l'optimum de croissance, créant un stress. L'organisme n'a alors pas d'autre choix pour survivre que de réagir activement contre ce stress, soit par une réaction comportementale de fuite, en s'éloignant de la source de stress, soit en s'y adaptant et en développant des mécanismes régulateurs.

#### b. L'importance de l'homéostasie face aux différents stress du milieu

Afin de survivre à ces différents stress, il est donc capital pour les organismes de posséder et de mettre en place une série de mécanismes homéostatiques. Ainsi, certains organismes possèdent par exemple des pompes à protons pour réguler le pH. Les pompes à protons sont des protéines transmembranaires de transport actif utilisant de l'ATP pour transporter des ions H<sup>+</sup> contre leur gradient de concentration d'un compartiment cellulaire à un autre ou vers le cytoplasme. La concentration de protons étant responsable de l'acidité du milieu, diminuer ou augmenter le nombre d'H<sup>+</sup> permet de réguler le pH [4].

## A.

### Éléments majeurs

Oxygène	46,6 %	Potassium	2,50 %
Silicium	27,7 %	Magnésium	2,00 %
Aluminium	8,1 %	Titane	0,44 %
Fer	5,0 %	Hydrogène	0,14 %
Calcium	3,63 %	Phosphore	0,11 %
Sodium	2,80 %	Manganèse	0,10 %

### Éléments traces

- 10 éléments représentant ensemble 0,318 % et parmi lesquels :
 

Fluor	0,07 %	soit 700 mg/kg
Chlore	0,02 %	soit 200 mg/kg
Chrome	0,02 %	soit 200 mg/kg
Vanadium	0,01 %	soit 110 mg/kg
- 14 éléments représentant ensemble 0,048 %, par exemple :
 

Nickel	0,0080 %	soit 80 mg/kg
Zinc	0,0065 %	soit 65 mg/kg
Azote	0,0046 %	soit 46 mg/kg
Cuivre	0,0045 %	soit 45 mg/kg
Cobalt	0,0023 %	soit 23 mg/kg
Plomb	0,0015 %	soit 15 mg/kg
- 22 éléments représentant ensemble 0,0065 % dont :
 

Bore	0,0003 %	soit 3 mg/kg
Molybdène	0,0001 %	soit 1 mg/kg
- 22 éléments représentant ensemble 0,0004 %, comme :
 

Iode	0,00003 %	soit 0,3 mg/kg
Cadmium	0,00002 %	soit 0,2 mg/kg
Sélénium	0,000009 %	soit 0,09 mg/kg

## B.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	* Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	** Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Ff	Uup	Lv	Uus	Uuo

\* La Ce Pr Nd Pm Sm Eu Gd Tb Dy Ho Er Tm Yb

\*\* Ac Th Pa U Np Pu Am Cm Bk Cf Es Fm Md No

The four organic basic elements Quantity elements Essential trace elements

Suggested function from biochemistry and handling but no identified biological function in humans

**Fig. 1: Tableau récapitulatif des éléments-traces et des oligo-éléments.** A : La liste des éléments majeurs constitutifs de la croûte terrestre et les éléments-traces. B : un tableau périodique reprenant, en vert clair, les oligo-éléments. Source : A. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols, Denis Baize. B. Ultratrace minerals. Authors: Nielsen, Forrest H. USDA, ARS Source: Modern nutrition in health and disease / editors, Maurice E. Shils et al. Baltimore : Williams & Wilkins, c1999., p. 283-303

De nombreux organismes sont également capables de contrôler l'homéostasie d'atomes ou de molécules potentiellement toxiques comme le fer par exemple. Les cellules mammaliennes mettent en place le système IRP/IRE pour réguler la prise, le stockage et l'utilisation du fer [4]. Il existe des protéines régulatrices (les IRPs) qui peuvent lier des éléments de réponses (les IREs). Cette liaison des IRPs sur les IREs va activer ces derniers, qui réguleront la traduction de protéines responsables de l'homéostasie du fer. Les IRP sont activées lorsque la concentration en fer est perçue comme anormalement basse et iront simultanément favoriser la traduction des protéines responsables de l'import du fer et inhiber la traduction des protéines qui le retiennent ou l'expulsent [4].

Pour un organisme, les stress cellulaires peuvent être de natures diverses : carence en nutriments, présence de composés toxiques, écarts de pH et de température, ou encore un excès ou carence en métaux lourds. C'est à ce dernier stress que nous allons nous intéresser dans le cadre de ce mémoire.

## II) L'importance des oligo-éléments

### a. Définitions et concepts, notion d'éléments-traces métalliques et d'oligo-éléments

Les métaux lourds sont des composés métalliques toxiques présents dans l'environnement. La notion de "métaux lourds" est un terme vernaculaire, sans définition stricte. Pour pallier à ce problème de définition, la notion géochimique "d'éléments-traces métalliques" a été établie [5]. Les "éléments-traces métalliques" sont définis comme étant "les 68 éléments minéraux constitutifs de la croûte terrestre qui ont une concentration strictement inférieure à 0,1% du total de cette dernière" [6]. Ils ne représentent que 0,6% du total de la croûte terrestre, les 99,4% restant étant composés des 12 "éléments majeurs" tels que l'oxygène, le sodium, le calcium ou le silicium. (Fig. 1)

Cette terminologie ne supprime toutefois pas complètement les concepts plus anciens de "métaux lourds", "métaux de transition" ou de "métaux toxiques". Certaines substances comme le fer, listé comme métal lourd, est exclu de la définition des éléments-traces puisqu'il est présent à plus de 0,1% dans la composition de la croûte terrestre. Bien que fréquemment utilisée dans les articles scientifiques, la définition d'élément-trace peut donc être problématique d'un point de vue biologique, puisqu'elle exclut des composés importants. C'est pourquoi il sera préféré dans ce travail la notion d'oligo-éléments et oligo-éléments essentiels.

Les oligo-éléments sont définis comme étant les minéraux de nutrition requis pour la croissance d'un organisme. Ils sont dits essentiels si leur absence est néfaste pour la cellule. Leur excès est généralement toxique, voire létal, pour l'organisme. Il s'agit donc de substances indispensables à la vie, mais généralement toxiques à de trop fortes concentrations. Sont par exemple considérés comme oligo-éléments le zinc, le bore, le cuivre, le magnésium, l'iode ou encore le fer.



## **b. Exemples d'oligo-éléments et leurs fonctions**

Les oligo-éléments, bien que présents en très faibles concentrations, constituent une réserve de nutriments nécessaire au bon fonctionnement biologique.

Par exemple, le zinc est un cofacteur essentiel pour de nombreuses protéines ou enzymes, notamment pour des protéines de réparation de l'ADN ou des facteurs de transcription comme Gal4 [7][8]. Un mutant de GAL4, caractérisé par une affinité réduite pour le zinc, adopte une conformation anormale et possède une activité réduite. Cette perte de fonction est corrigée par un ajout important de zinc dans le milieu, suggérant que le lien zinc-cystéine constituant les "doigts" de cette protéine est capital pour le bon repliement du polypeptide [8].

Le fer est aussi vital pour l'organisme. Outre sa contribution essentielle dans le fonctionnement des hémoprotéines et dans le transport de l'oxygène, il peut, lui aussi, servir de cofacteur à de nombreuses réactions enzymatiques. Par exemple, le fer est le cofacteur de l'EFE (ethylene-forming enzyme) et sa chélation entraîne l'arrêt de l'activité de cette enzyme [9].

Un autre oligo-élément indispensable est le cuivre. Ce métal lourd est un composant essentiel du milieu, jouant un rôle clé dans la biologie cellulaire.

## **III) Le cuivre et son importance dans les processus biologiques**

### **a. Généralités**

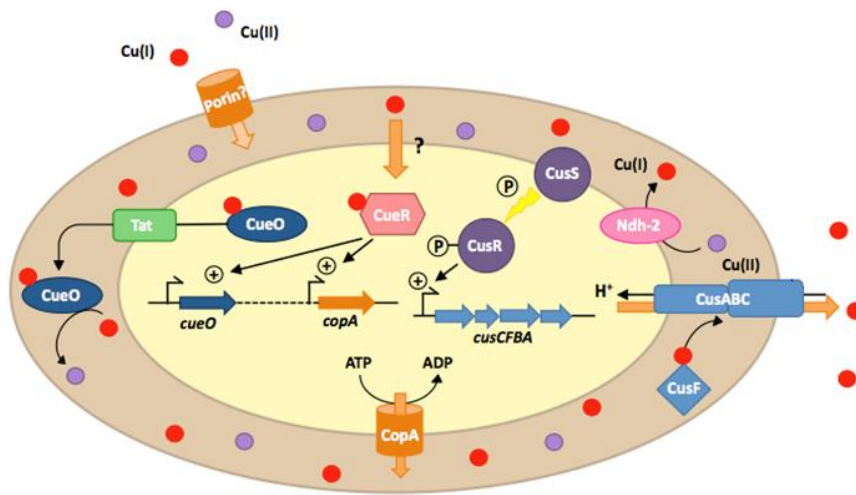
#### ***i. Propriétés physico-chimiques***

Le cuivre est un "élément trace naturel". D'un point de vue physique, c'est un métal ductile, conducteur de courant, servant dans de nombreux alliages. Du point de vue chimique ionique, le cuivre peut se trouver sous deux états redox différents, et possède par conséquent deux formes ioniques distinctes : la forme réduite  $\text{Cu}^+$  et la forme oxydée  $\text{Cu}^{2+}$  [10]. La forme réduite  $\text{Cu}^+$  est considérée comme insoluble et se lie préférentiellement à certains groupements comme les sulfures ou les alcènes [10]. Sous sa forme oxydée, en revanche, il est facilement soluble dans l'eau et se lie à de nombreux composants chimiques (réalisant notamment souvent des liaisons très stables avec l'azote ou plus labiles avec l'oxygène).

#### ***ii. Les sources de cuivre dans l'environnement***

Le cuivre peut être trouvé naturellement dans l'environnement. Par exemple, il est présent dans les sédiments, les roches ou d'autres sources trophiques, à de plus ou moins hautes concentrations selon les milieux. Cependant, l'activité humaine tend à augmenter de manière notable la présence de ce métal dans l'environnement. De manière non exhaustive, nous pouvons notamment citer l'agriculture, qui emploie le cuivre à large échelle comme stratégie antifongique et antimicrobienne, ou l'activité industrielle, en général, qui rejette de larges quantités de cuivre comme déchets de production [11][12].





**Fig. 2: Vue d'ensemble des systèmes de régulation de l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *E. coli*.** CueR, en réponse à une augmentation du cuivre, active la transcription de *copA* et *cueO*. CopA transfère le cuivre Cu<sup>+</sup> du cytoplasme vers le périplasma. CueO transporte 4 ions Cu<sup>+</sup> du cytoplasme vers le périplasma, où il sera oxydé en Cu<sup>2+</sup>. Le senseur CusS peut mener, via CusR, à l'expression de l'opéron *cusCFBA*. Ce système permet d'expulser le cuivre hors de la bactérie. Source : Schéma d'E. Lawarée

Les rejets quotidiens, comme les résidus de plaquettes de frein, ou la pollution de l'eau de pluie par le cuivre présent dans les gouttières, représente également une part non négligeable de cette "pollution au cuivre". Le cuivre étant utilisé dans de nombreux matériaux ou produits, les sources de pollutions sont donc nombreuses et fréquentes. Par exemple, du cuivre est ajouté dans la peinture des coques des bateaux pour limiter les dépôts d'algues sur celles-ci. Le transport maritime peut, à ce titre, également être cité comme contribuant à la dissémination du cuivre dans l'environnement [11].

### *iii. Concentrations normales et en milieux pollués*

Dans l'environnement naturel, le cuivre peut-être trouvé dans l'eau à une concentration moyenne de 10 ou 15 µg/L. Les milieux naturels étant très variés, la gamme de concentrations de cuivre présent à l'état naturel est cependant très large, pouvant aller de 0,6 à 400 µg/L. Cet écart important est principalement expliqué par la nature du terrain, certaines eaux étant passées par infiltration dans des sols ou des roches contenant des gisements naturels de cuivre [12]. Les rejets extérieurs liés aux activités humaines peuvent toutefois faire grimper drastiquement cette concentration. Harrison et Bishop ont par exemple montré que dans des sédiments pris dans le lit de rivières considérées comme "standards", non-polluées, la concentration de cuivre était en moyenne de 50 mg/kg de matière sèche, tandis que dans les cas des pollutions les plus importantes, ce taux pouvait monter à plusieurs grammes par kilo [11]. Cette augmentation du taux de cuivre peut être relativement problématique. En effet, si le cuivre est essentiel à la vie cellulaire, il peut aussi être néfaste pour les organismes lorsqu'il est présent en trop grandes quantités [10][13].

## **b. Homéostasie du cuivre chez les bactéries**

### *i. Le cuivre : un oligo-élément à double tranchant*

Le cuivre possède, aussi bien dans sa forme réduite qu'oxydée, un rôle essentiel en temps que cofacteur de certaines enzymes-clés, comme par exemple la superoxyde dismutase (SOD)[14][10]. La superoxyde dismutase transforme l'anion superoxyde radicalaire,  $O_2^-$ , en oxygène et peroxyde d'hydrogène, moins réactif et moins toxique pour les cellules. Les anions  $O_2^-$  surviennent de manière naturelle, et font partie de divers processus biologique. Ils sont, par exemple, le produit de la NADPH oxydase, et peuvent être utilisés comme système de défense contre des microbes. La superoxyde dismutase est donc capitale pour limiter la cytotoxicité des ions  $O_2^-$ , pouvant entraîner des dommages cellulaires ou former des composés encore plus toxiques, comme le peroxyde d'hydrogène. Le cuivre peut aussi jouer un rôle de cofacteur avec d'autres enzymes, dont plusieurs oxydases telles que la galactose oxydase ou la polyphénol oxydase [15]. Certains facteurs de transcription, comme Ace1 chez *Saccharomyces cerevisiae* ont besoin du cuivre pour acquérir leur conformation fonctionnelle [16]. A faible concentration donc, le cuivre participe au bon fonctionnement cellulaire en général.



En revanche, à haute concentration, le cuivre devient toxique. En effet, la forme ionique réduite du cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) est capable de catalyser une réaction de type Fenton [ $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ] [10], générant ainsi des radicaux hydroxyles à haut potentiel oxydant. Ces radicaux pourront, à leur tour, oxyder différents substrats comme des protéines, des lipides, ou même de l'ADN conduisant éventuellement à la mort cellulaire. Cependant, cette cytotoxicité due au cuivre peut également être indépendante d'un stress oxydant. En effet, le cuivre, qu'il soit sous forme réduite ou oxydée, peut altérer la conformation et la fonction de protéines ou polysaccharides en remplaçant certains ions natifs de ces structures biologiques [10].

La toxicité du cuivre a été exploitée très tôt par l'Homme qui s'en est largement servi comme stratégie antibactérienne. On retrouve des traces de son usage dès 2000 ans AC, lorsque les Egyptiens constatèrent que leurs récipients en cuivre pouvaient, d'une certaine manière, "purifier" l'eau et être utiles en médecine. Les premiers pionniers américains avaient pour habitude de mettre des pièces de cuivre dans les tonneaux pour conserver l'eau potable durant leurs voyages et ainsi éviter la dysenterie. Depuis, le cuivre est régulièrement utilisé à cette fin antimicrobienne, plus particulièrement depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, époque à partir de laquelle il fut largement utilisé dans l'industrie agricole, principalement pour combattre le mildiou [17]. La nature exploite également cette propriété bactéricide du cuivre, ce dernier étant utilisé comme mécanisme de défense par les plantes ou les animaux. Certaines plantes de la famille des poaceae font par exemple transiter du cuivre dans leur phloème pour limiter les infections bactériennes ou parasitaire [18].

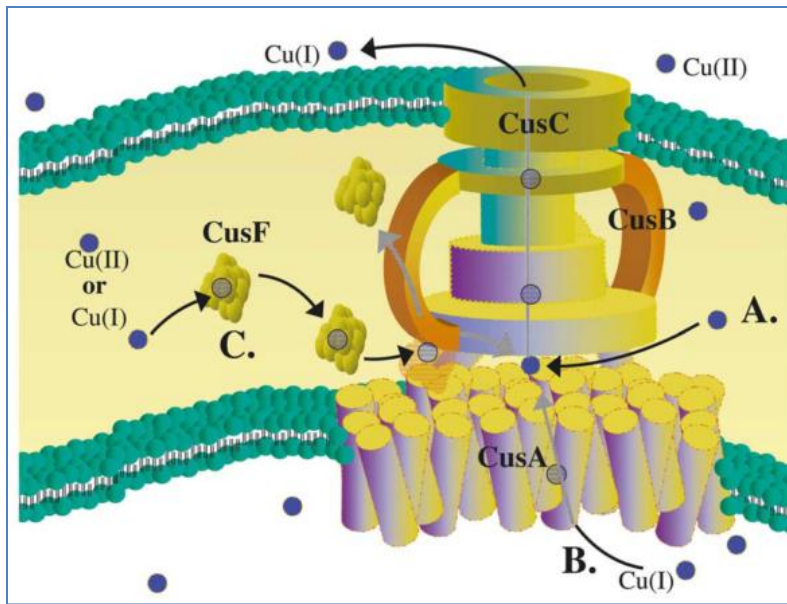
Le cuivre est donc à la fois indispensable à faible concentration et toxique à plus haute dose. D'importantes variations en cuivre dans l'alimentation peuvent être à l'origine de certaines pathologies, comme la myélopathie [19] ou la maladie de Wilson [20][21]. C'est pourquoi l'homéostasie du cuivre doit être finement régulée par les organismes vivants afin de maintenir un taux de cuivre suffisamment élevé pour le fonctionnement cellulaire mais suffisamment bas pour en éviter les effets cytotoxiques. Cette régulation a été étudiée de manière relativement détaillée chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* ou encore *Xanthomonas axonopodis* [13][22][23].

## **ii. Mise en place de systèmes actifs pour contrôler la concentration en cuivre**

### **1. Les systèmes de régulation chez *E. coli***

Différentes recherches ont élucidé les mécanismes mis en place par les bactéries pour réguler la concentration intracellulaire en cuivre. Ces mécanismes ont principalement été étudiés chez *E. coli*, sans doute en raison du caractère "modèle" de cette gamma-protéobactérie [24][25][26].

Chez *E. coli*, deux grands systèmes d'homéostasie du cuivre ont été caractérisés : le système Cue et le système Cus. Lorsque la concentration intracellulaire du cuivre est en dessous de 10  $\mu\text{M}$ , seul le système Cue est actif et transporte le cuivre depuis le cytoplasme vers le périplasme. En revanche, si la concentration intracellulaire en cuivre continue à augmenter, le système Cus s'active également en parallèle pour aider à la détoxification du cytoplasme et du périplasme en éjectant le cuivre directement dans le milieu extracellulaire. (Fig. 2)



**Fig. 3 : Système CusCFBA chez *E. coli*.** CusABC forme le canal, CusA récupérant le cuivre dans l'espace cytoplasmique, et CusC étant ancré en membrane externe. CusF est une chaperonne située dans l'espace intermembranaire. Source : C. Rensing and G. Grass, "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment," FEMS Microbiology Reviews, vol. 27, no. 2-3, pp. 197-213, Jun. 2003.

## Système Cue

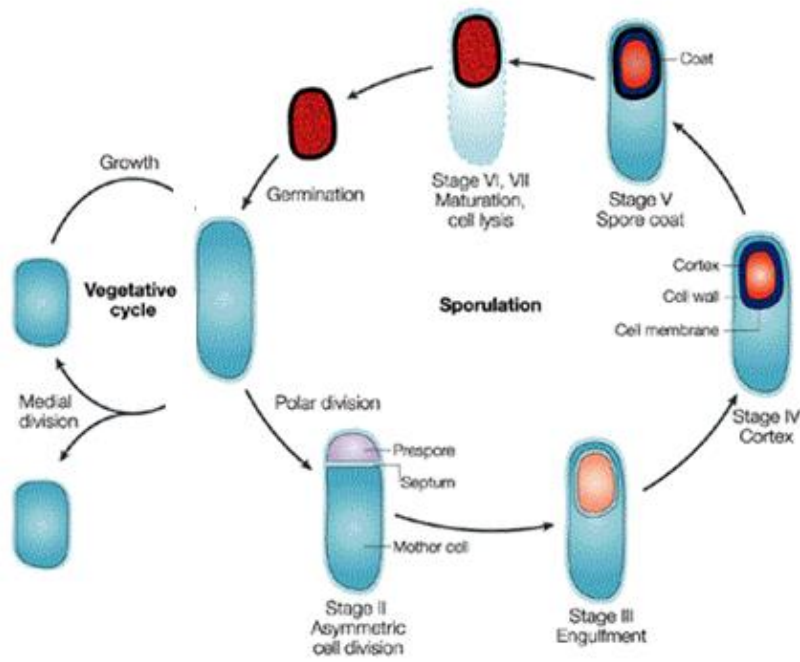
Le système Cue a pour premier acteur CueR. Cette protéine est à la fois un senseur cytoplasmique de cuivre (jusqu'à un atome par cellule) et un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille MerR. Les protéines MerR ont la capacité de réguler positivement la transcription en reconfigurant l'espacement de 19 paires de bases entre les éléments -35 et -10 du promoteur, permettant ainsi une interaction efficace de l'ARN polymérase et, par conséquent, la transcription des gènes cibles. En présence de cuivre dans le cytoplasme bactérien, CueR va donc se lier à un promoteur spécifique, permettant la transcription des gènes *cueO* et de *copA* [26].

CueO est une multicopper oxydase, chargée de lier quatre ions  $\text{Cu}^+$  présents dans le cytoplasme avant de les transloquer dans le périplasma via la voie TAT. CueO possède, en effet, une séquence peptidique reconnue par la voie TAT, ce qui lui permet de traverser la membrane interne en restant parfaitement repliée. Une fois dans le périplasma, CueO oxyde les quatre ions  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , moins réactif et moins toxique que le  $\text{Cu}^+$ . De plus en plus d'études mettent en évidence des séquences homologues de *cueO* dans de nombreux autres organismes, ce qui tend à montrer son importance [10][24][26].

CopA, quant à elle, est une ATPase de type "P" assez peu décrite [24]. Les ATPases de type P sont des protéines de transport actif d'ions contribuant à la régulation du potentiel électrochimique membranaire. Les ions chargés sont transportés à travers une membrane lipidique contre leur gradient de concentration, ce qui nécessite la consommation d'ATP. Dans le cas d'*E. coli*, la pompe transporterait le cuivre depuis le cytoplasme vers l'espace intermembranaire.

## Système Cus

Le système Cus est activé lorsque la concentration intracellulaire en cuivre est supérieure à 10  $\mu\text{M}$ . Le premier acteur de ce système est le système à deux composants CusS et CusR. Lorsque la concentration périplasmique en cuivre est trop élevée dans le périplasma, le senseur CusS, ancré en membrane interne, s'autophosphoryle sur un résidu histidine, puis va activer le régulateur transcriptionnel CusR en transférant le phosphate sur un aspartate. CusR phosphorylé active alors la transcription de l'opéron *cusCFBA*. Les protéines CusC, CusB et CusA forment un canal permettant d'éjecter le cuivre du cytoplasme directement dans le milieu extracellulaire. CusA est une protéine faisant partie de la famille RND (*Resistance Nodulation cell Division*) et est associée à l'export d'ions métalliques contre des protons. C'est la présence de trois méthionines conservées au niveau du site de fixation du cuivre de CusA qui confère la spécificité de liaison au cuivre et de son relargage. CusB fait partie de la famille des protéines de fusion membranaire. Elle est ancrée en membrane cytoplasmique et possède un long domaine traversant le périplasma. CusC est une protéine ancrée en membrane externe. Enfin, CusF est une chaperonne périplasmique liant le cuivre présent dans ce compartiment et capable de le transférer directement au canal CusCBA [26]. (Fig. 3) Lorsque *E. coli* est saturée en cuivre, un troisième système semble se mettre en place, le système Pco. Ce dernier est encore assez peu caractérisé et n'est pas présent dans toutes les souches d'*E. coli*. Il comprend plusieurs protéines encodées par un opéron comprenant 7 gènes (*pcoABCDRSE*). Il semblerait que PcoA ait une action similaire à CueO [27], tandis que PcoC est une protéine périplasmique liant un atome de cuivre par molécule. Concernant PcoE, aucune implication de cette protéine dans l'homéostasie du cuivre n'a pu être démontrée à ce jour [27].



**Fig. 4 : Cycles cellulaires de *B. subtilis*.** A gauche, le cycle végétatif, par division médiane. A droite, le cycle de sporulation. Une division asymétrique entraîne la formation d'une préspore à l'un des pôles. La préspore passera par un enkystement, un "coating" et une maturation avant d'être libérée dans l'environnement. La germination de cette spore générera une nouvelle *B. subtilis*. Source : J. Errington, "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*," *Nature Reviews Microbiology*, pp. 1–2, 2003.

## 2. La régulation du cuivre chez d'autres espèces bactériennes

Chez *Pseudomonas syringae*, une gamma-protéobactérie, des systèmes semblables à ceux identifiés chez *E. coli* ont été découverts, bien qu'ils soient encore relativement peu caractérisés. Les principales protéines homéostatiques du cuivre chez *P. syringae* sont encodées par l'opéron *copABCD*. CopA et CopC sont des protéines périplasmiques, tandis que CopB est ancrée dans la membrane externe [28]. Des systèmes similaires ont également été découverts chez *Xanthomonas campestris*, une autre gamma-protéobactérie [29].

*Enterococcus hirae*, bacille gram-positif, possède également des systèmes de régulation de la concentration intracellulaire en cuivre. L'opéron *cop* contient les quatre gènes *copABYZ*. CopA et CopB sont des ATPases relativement similaires à l'ATPase CopA de *E. coli*. CopY est un répresseur protéique et CopZ est une chaperonne pour le cuivre [30].

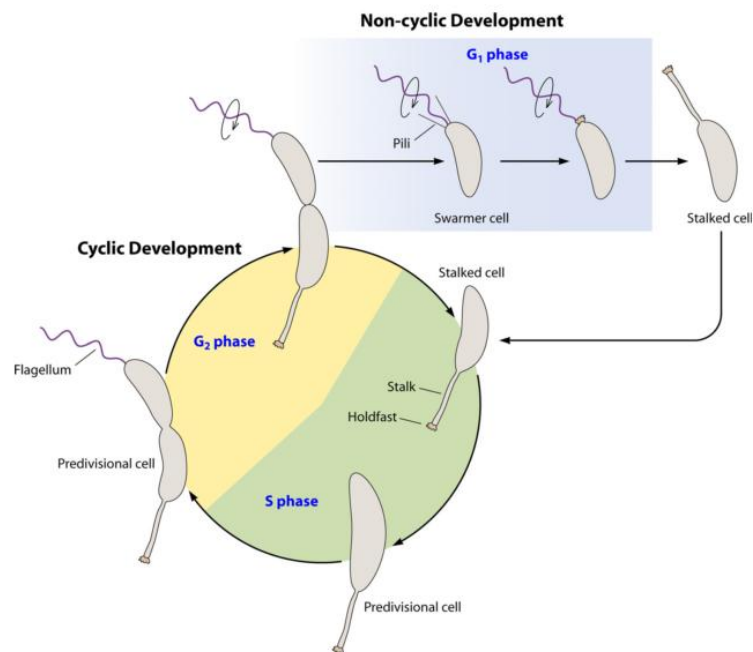
### c. Le cuivre perturbe le cycle cellulaire de plusieurs bactéries

Des études récentes ont démontré que le cuivre peut avoir un impact sur le cycle cellulaire et le développement bactérien.

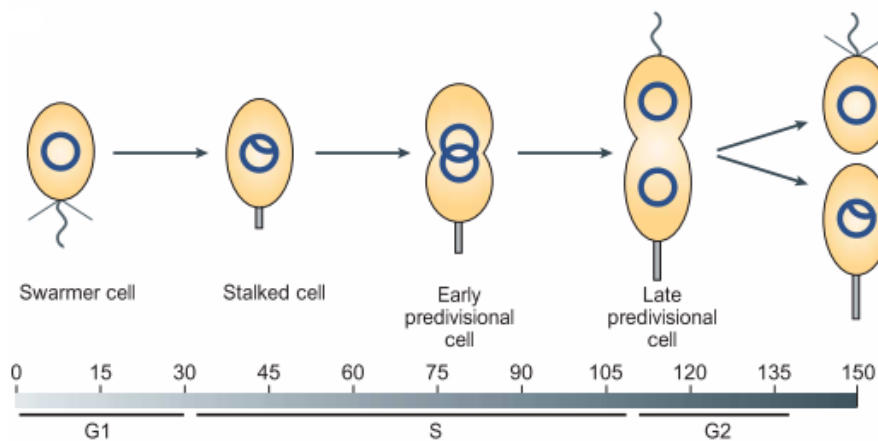
Pour certaines bactéries qui possèdent plusieurs formes cellulaires au cours de leur cycle cellulaire, un changement de concentration en cuivre favorise parfois une de ces formes spécifiques, qui est probablement plus adaptée à cette variation environnementale [31]. C'est par exemple le cas de la bactérie Gram-positif *Bacillus subtilis*. Cet organisme possède deux cycles cellulaires distincts. D'une part, lorsque les conditions environnementales sont favorables, cette bactérie se réplique par fission binaire, via un cycle végétatif. En revanche, lorsque les conditions environnementales sont moins optimales, voire défavorables, *B. subtilis* entre dans une phase de sporulation. Les spores de *B. subtilis* sont remarquablement résistantes, même dans des conditions extrêmes de températures ou de dessiccation [32][33]. (Fig. 4)

Le cuivre étant un élément essentiel, l'absence de cuivre dans le milieu de culture constitue un stress important. En réponse à ce stress, *B. subtilis* entre donc en sporulation. Lorsque les conditions redeviennent plus favorables, les spores germent et la bactérie peut reprendre son cycle végétatif. Inversement, un excès de cuivre dans le milieu extracellulaire peut également favoriser la sporulation [33].





**Fig. 5 : Cycle cellulaire de *C. crescentus*.** La forme flagellée (swarmer cell) doit se différencier en cellule pédonculée (stalked cell) pour pouvoir répliquer son ADN et se diviser. Source : P. D. Curtis and Y. V Brun, "Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*," Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, vol. 74, no. 1, pp. 13–41, Mar. 2010.



**Fig. 6 : Déroulement du cycle cellulaire de *C. crescentus* selon le temps.** La forme flagellée (swarmer cell) doit se différencier en cellule pédonculée (stalked cell) pour pouvoir répliquer son ADN et se diviser. La progression du temps à travers les phases du cycle cellulaire est indiquée en min, et mesurée dans un milieu M2G (milieu pauvre défini). Source : J. M. Skerker and M. T. Laub, "Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*," Nature reviews. Microbiology, vol. 2, no. 4, pp. 325–37, Apr. 2004

### III) *Caulobacter crescentus* : Un modèle d'étude idéal

#### a. Généralités

*C. crescentus* est une  $\alpha$ -protéobactérie aquatique oligotrophe dont le cycle cellulaire aboutit à la génération de deux cellules filles de formes distinctes : une forme mobile nageuse, et une forme pédonculée fixée [34]. *C. crescentus* est étudiée intensivement depuis des années comme modèle pour la division asymétrique et la différenciation polaire. De nombreux mécanismes de développement cellulaire élucidés chez *C. crescentus* ont été extrapolés avec succès à d'autres  $\alpha$ -protéobactéries aux modes de vie très différents, suggérant que ces mécanismes ont été hérités d'un ancêtre commun. *C. crescentus* est également une espèce pionnière dans des environnements pollués, suggérant que cette bactérie possède de nombreux mécanismes de résistance pour de nombreux composants toxiques [35].

#### b. La division asymétrique

##### i. Le cycle cellulaire particulier de *C. crescentus*

Comme mentionné dans le point précédent, *C. crescentus* est caractérisé par une division asymétrique. Une cellule mère génère deux cellules de taille et de morphologie très différentes. La plus petite est nommée "cellule flagellée". C'est une cellule mobile se déplaçant, comme son nom l'indique, à l'aide d'un flagelle. La plus grande des deux cellules filles est nommée "cellule pédonculée". Cette forme sessile s'attache au substrat via un pédoncule. Il est communément admis que la cellule bactérienne nageuse est capable, par chimotaxie, de rechercher une zone favorable dans son environnement avant de se différencier en pédonculée qui, à son tour, répliquera son ADN et se divisera [36][37]. (Fig. 5 et 6)

La cellule nageuse flagellée est incapable de répliquer son matériel génétique sans se différencier en cellule pédonculée. Dès lors, la cellule flagellée doit d'abord passer par une étape de différenciation, se transformant en cellule pédonculée, pour mener à bien le cycle cellulaire. Celle-ci peut répliquer son ADN menant à la formation d'une cellule prédivisionnelle contenant 2 chromosomes identiques. Cette cellule prédivisionnelle peut alors se diviser, donnant à nouveau deux cellules distinctes, une pédonculée et une flagellée. La cellule pédonculée peut directement répliquer son ADN, tandis que la cellule flagellée doit, par contre, se différencier à nouveau en cellule pédonculée afin de recommencer un cycle de division cellulaire.

Ce sont principalement les régulateurs CtrA, DnaA et GcrA qui contrôlent l'initiation de la réplication de l'ADN et qui permettront à la cellule pédonculée d'entrer en phase S (la phase de réplication de son ADN), ce qui permettra d'atteindre la phase G2 (phase prédivisionnelle) du cycle cellulaire. Cette dernière phase est l'étape finale du cycle cellulaire où la cellule pédonculée se divise en deux cellules filles, bouclant ainsi la boucle du cycle cellulaire [37].



CtrA est une protéine régulatrice, régulant l'expression de près d'un quart (95) de tous les gènes régulés au cours du cycle cellulaire chez *Caulobacter*, de manière directe ou indirecte [38]. CtrA possède un site de liaison à l'ADN et, quand il est actif, lie une origine de réplication, inhibant ainsi la réplication de l'ADN. La transcription du gène *ctrA* est contrôlée par un promoteur faible P1 et un promoteur fort P2. Ces promoteurs possèdent des sites de liaisons pour CtrA, permettant à la protéine de s'autoréguler par *feed-back* après avoir été produite. Ce jeu de régulation permet, avec l'aide d'autres protéines, de faire varier le niveau de production de CtrA au cours du temps, contrôlant de cette manière la réplication du matériel génétique de la bactérie et organisant le cycle cellulaire. CtrA est également contrôlé de manière post-traductionnelle, et peut notamment être dégradé par la protéase ATP dépendante ClpXP, ou par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation [36].

DnaA est également un acteur clé de la régulation du cycle cellulaire. Il possède un rôle relativement antagoniste à CtrA, puisque son rôle principal est d'initier la transcription de certains gènes [37]. DnaA est elle aussi finement régulée dans le temps afin d'éviter par exemple une initiation de la transcription lors de la phase G1 dans les cellules flagellées.

GcrA est également un régulateur capital du cycle cellulaire. Il contrôle notamment l'expression de l'expression du promoteur P1 de *ctrA*, et contrôle donc indirectement le cycle cellulaire.

## *ii. Impacts des facteurs environnementaux sur le cycle cellulaire*

Il a été montré que certains facteurs environnementaux pouvaient avoir un impact sur le cycle cellulaire de *C. crescentus*. En effet, des carences en nutriments peuvent privilégier une forme cellulaire.

En effet, les deux formes cellulaires semblent avoir des sensibilités inégales pour certains stress environnementaux et se comportent de manières différentes. Alors que la cellule pédonculée se fixera et tentera de se diviser, la cellule flagellée peut "explorer" l'environnement, trouvant peut-être un substrat plus favorable. Ces deux stratégies contraires peuvent être autant d'adaptations possibles face aux stress, et l'une des deux sera peut-être sélectivement favorisée [39].

Dans le cas d'une carence en azote, on peut remarquer des changements dans l'expression de *ctrA* et *dnaA*, et dans plus 400 autres gènes [40]. Il a également été observé que l'initiation de la biogenèse du pédoncule et la transition de la phase G1 à la phase S qui coïncident dans des conditions standards étaient séparées et ne commençaient pas au même moment [40]. La carence en azote semble également avoir un impact important sur le cycle cellulaire puisque qu'elle empêche la différenciation des cellules flagellées [41][Communication personnelle – Régis Hallez]. Lorsque que cette carence est importante, mais pas totale, cela retarde la différenciation en cellule pédonculée [39]. L'azote étant à la base du métabolisme des acides aminés et des nucléotides, il est compréhensible que sa déplétion entraîne des retards de division.



### c. *C. crescentus* – Une faculté de colonisation hors-norme, même dans les milieux contaminés

*C. crescentus* est également une espèce pionnière dans les environnements pollués. En effet, elle fait partie des premières espèces bactériennes à coloniser des lieux considérés comme peu propices au développement des organismes, ce qui suggère qu'elle possède des mécanismes de résistance efficaces contre les nombreux composés toxiques présents dans ce genre de milieux [35][42].

Les analyses génomiques et les nombreuses études conduites jusqu'à présent sur *Caulobacter* ont permis de découvrir de nombreux mécanismes de résistance aux métaux lourds, tels que les couples protéiques GroES/GroEL ou DnaK/DnaJ[43], ou les ECF sigma factors [44].

## **Objectifs du mémoire**

L'objectif de ce mémoire est donc de tenter d'apporter un élément de réponse à la question : "Le cuivre peut-il influencer le cycle cellulaire ?". Des stress comparables ont déjà été mis en évidence pour d'autres composés ou pour d'autres organismes. Pour répondre à cette question, *Caulobacter* est l'organisme modèle idéal, en raison de son cycle cellulaire bien caractérisé, de sa division asymétrique, et de sa capacité à croître dans des environnements pollués.

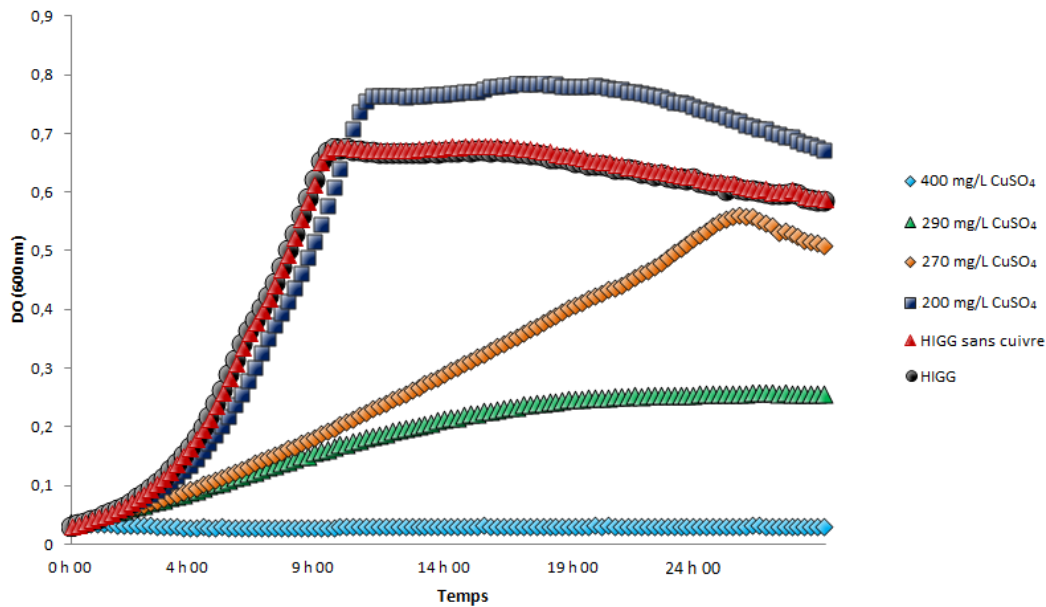
Nous avons choisi d'étudier deux gènes potentiellement impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*, *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*. Les données existantes suggèrent que ces deux gènes seraient, *a priori*, régulés au cours du cycle cellulaire [45]. Le but de notre travail consiste à vérifier le rôle de ces gènes et à déterminer si ils sont effectivement régulés au cours du cycle cellulaire. Une expression variable de ces gènes au cours du cycle cellulaire pourrait indiquer que l'une des deux formes de *C. crescentus* est plus adaptée aux hautes concentrations en cuivre.



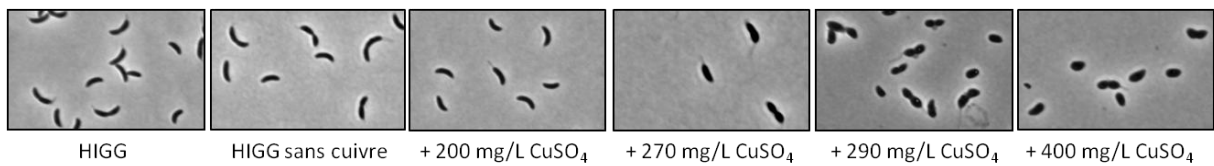
# Résultats



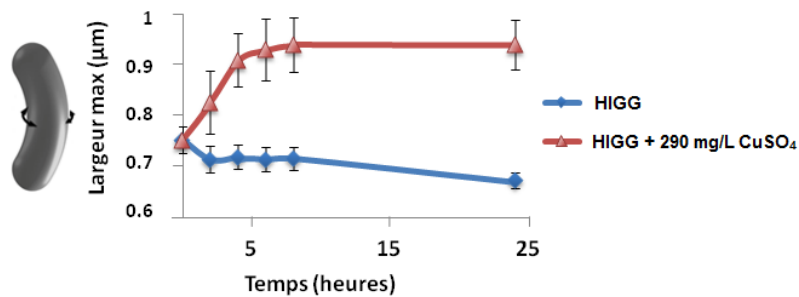
**A.**



**B.**



**C.**



**Fig. 7 : Mesure de la sensibilité au cuivre de la souche CB15N. A. Courbes de croissance pour la souche CB15N en HIGG avec différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>.** La souche CB15N a été cultivée en HIGG (courbe noire), HIGG sans cuivre (courbe Rouge), ainsi en HIGG sans cuivre supplémentée par 200, 270, 290 ou 400 mg/L de CuSO<sub>4</sub> (respectivement les courbes bleu foncée, orange, verte et bleu claire). La densité optique <sub>600nm</sub> a été mesurée toutes les 15 min. **B. Observation de la souche CB15N en microscopie à contraste de phase.** Photo de la souche sauvage cultivée 8 h en HIGG sans cuivre où diverses concentrations en cuivre ont été ajoutées. Un gonflement des bactéries ("Lemon shape") est observé lorsque la concentration en CuSO<sub>4</sub> excède 270 mg/L. **C. Mesure de la largeur cellulaire.** Graphique représentant la largeur cellulaire au cours du temps. La souche CB15N est cultivée pendant 8 h en HIGG en présence de 290 mg/L de CuSO<sub>4</sub>. La largeur cellulaire est mesurée toute les 2 h (jusque 8 h) et après 24 h (analyse Matlab).

## Résultats

Afin d'étudier l'impact du cuivre sur le cycle cellulaire de *C. crescentus*, il était tout d'abord important de caractériser la sensibilité au cuivre de cette bactérie. Dans un premier temps, nous avons tenté d'identifier des acteurs potentiels de l'homéostasie du cuivre dans le génome de *C. crescentus* grâce à des analyses bioinformatiques. Ensuite, nous avons réalisé des mutants de délétion pour les gènes candidats préalablement identifiés par l'analyse *in silico*. Les mutants ont enfin été caractérisés pour une éventuelle sensibilité accrue au cuivre.

### 1) Caractérisation de la sensibilité au cuivre chez *C. crescentus*.

La première partie de ce mémoire consistait à déterminer la sensibilité de *C. crescentus* face à un stress au cuivre. Pour ce faire, nous avons établi des courbes de croissance pour la souche sauvage (CB15N) cultivée en présence de différentes concentrations en cuivre et nous avons réalisé un test Live/Dead® ainsi que des observations en microscopie à contraste de phase.

#### A. La résistance au cuivre chez *C. crescentus*

Le but de cette expérience est de démontrer l'impact du cuivre sur la croissance de *C. crescentus*. Pour ce faire, la souche CB15N a été cultivée pendant 24 h dans un milieu dépourvu de cuivre (HIGG sans cuivre) où différentes concentrations de  $\text{CuSO}_4$  ont été ajoutées. L'HIGG sans cuivre est un milieu pauvre défini qui diffère de l'HIGG de part l'absence de cuivre dans la solution de métal 44 qui le compose. Ce milieu est utilisé afin de contrôler le plus précisément possible la concentration de cuivre mise en contact avec les bactéries. Cependant, il est important de réaliser que le milieu HIGG dit "sans cuivre" n'en est pas totalement dépourvu, aucun filtre n'étant assez restrictif que pour garantir une absence totale du moindre atome de cuivre. Certaines enzymes ont pourtant une sensibilité pour le cuivre très élevée, le détectant à une concentration extrêmement faible, de l'ordre de l'atome [46], ce qui signifie qu'elles pourraient fonctionner même dans un milieu dit "sans cuivre". Une fois mise en culture dans le milieu contenant différentes concentrations de cuivre, une mesure de la densité optique ( $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ ) des cultures a été réalisée toutes les 15 min.

De manière intéressante, il semble que la croissance de la souche CB15N ne soit pas affectée lorsque celle-ci est cultivée en présence de hautes concentrations en  $\text{CuSO}_4$  (jusqu'à 250 mg/L) (Fig. 7A). Toutefois, au-delà de cette concentration, la croissance de *C. crescentus* chute graduellement. Il est toutefois impossible, à travers cette expérience, de distinguer les bactéries mortes des bactéries en arrêt de croissance. C'est pourquoi un test Live/Dead® sera réalisé par la suite.



Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres composés cuivrés tels que le  $\text{CuCl}_2$  et le  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , suggérant que les observations réalisées sont bien spécifiques du cuivre. Après 9 h, les bactéries exposées à une concentration inférieure à 250 mg/L atteignent un plateau à une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,6 ou 0,7. Après cela, la densité optique diminue lentement, probablement à cause de la mort cellulaire.

## **B. Analyse morphologique de la souche sauvage lors de stress au cuivre**

Afin de déterminer l'effet du cuivre sur la morphologie cellulaire, la souche CB15N, cultivée en présence de différentes concentrations en cuivre, a été observée au microscope à contraste de phase.

La souche sauvage a donc été cultivée pendant 8 h dans le milieu HIGG sans cuivre additionné de différentes concentrations de  $\text{CuSO}_4$ . Après 8 h de culture, les bactéries sont déposées sur des « pads » d'agarose (contenant la même concentration de  $\text{CuSO}_4$  que le milieu liquide) et observées par microscopie à contraste de phase.

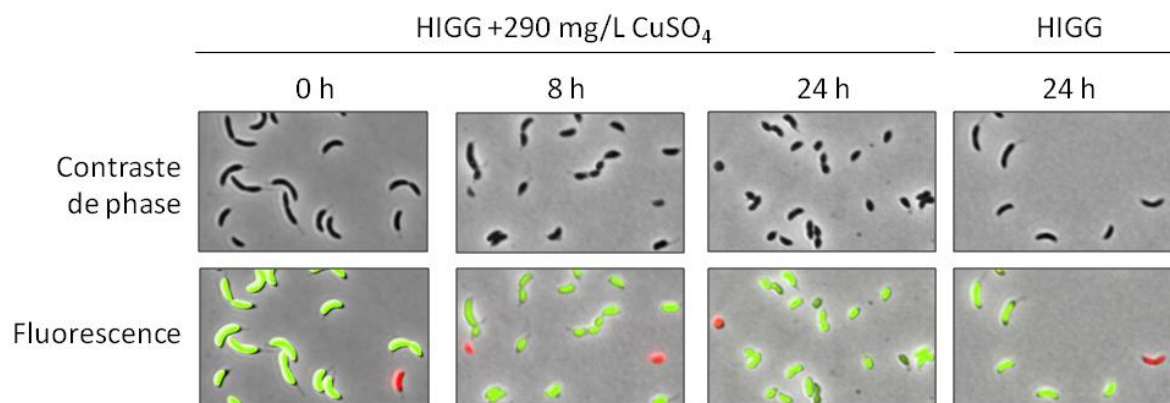
En conditions classiques (HIGG normal et HIGG dépourvu de cuivre), *C. crescentus* est une bactérie incurvée (Fig. 7B). Lorsque la CB15N est cultivée dans un milieu où la concentration en  $\text{CuSO}_4$  reste inférieure à 270 mg/L, aucune modification de la morphologie n'est observée. Au-delà de cette concentration, nous pouvons constater l'apparition progressive de "lemon shapes", c'est-à-dire d'un "gonflement" des bactéries (Fig. 7B). Une analyse par Matlab, qui mesure la largeur maximale des bactéries, montre qu'effectivement les cellules exposées à une haute concentration en cuivre (290 mg/L de  $\text{CuSO}_4$ ) sont plus larges que les bactéries non exposées au cuivre (Fig. 7B).

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres composés cuivrés tels que le  $\text{CuCl}_2$  et le  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ .

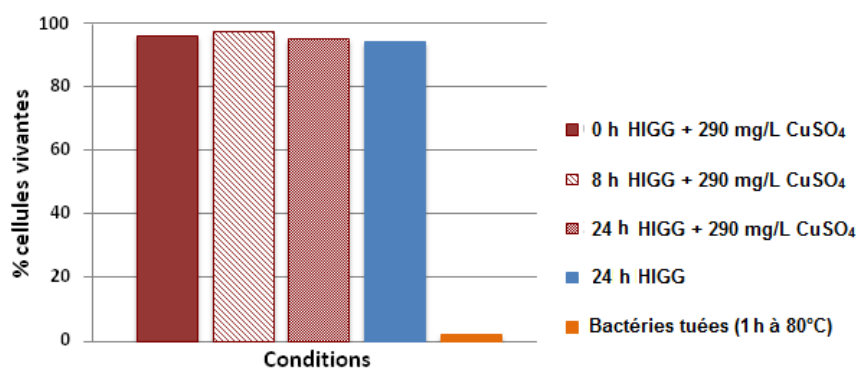
Afin de déterminer quand ce changement de morphologie a lieu, une cinétique a été réalisée. Pour ce faire, la souche CB15N a été cultivée dans un milieu HIGG contenant 290 mg/L de  $\text{CuSO}_4$ . Des échantillons bactériens ont ensuite été prélevés toutes les heures pendant 8 h et observés au microscope en contraste de phase. On constate une augmentation de la largeur des bactéries pratiquement immédiatement après ajout de cuivre et cette augmentation semble se stabiliser après 8 h (Fig. 7C).

Lorsque les bactéries cultivées pendant 8 h dans un milieu HIGG contenant 290 mg/L de  $\text{CuSO}_4$  sont lavées puis placées dans un milieu HIGG normal pendant 12 h, leur croissance reprend normalement. Il semblerait que ce changement de morphologie soit donc réversible. (Résultat généré par E. Lawarée). Il serait intéressant de déterminer exactement quand les bactéries sont capables de retrouver leur morphologie initiale.

**A.**



**B.**



**Fig. 8 : Résultats du test Live/Dead.** **A.** La souche CB15N est cultivée en présence de cuivre (290 mg/L de CuSO<sub>4</sub>) pendant 8 h ou 24 h. Un test Live/Dead est effectué à ces différents temps. **B.** Pourcentage de cellules vivantes selon les conditions testées en microscopie. Aucune augmentation de la mortalité cellulaire n'est visible lorsque les bactéries sont cultivées avec du cuivre comparé à la condition HIGG. Un contrôle positif (bactéries cultivées pendant 1 h à 80°C) a été réalisé.

### C. Le cuivre, aux doses testées, ne semble pas entrainer de mort cellulaire

Afin de déterminer le taux de mortalité cellulaire au sein d'une population, le test Live/Dead® a été utilisé. Ce test est basé sur l'utilisation de deux composés fluorescents : le SYTO9 et l'iodure de propidium. Le SYTO9 est un composé fluorescent marquant toute la population bactérienne en vert. L'iodure de propidium, quant à lui, ne pénètre que dans les bactéries dont la membrane cellulaire est endommagée, c'est-à-dire dans les bactéries mortes. Ces dernières apparaîtront en rouge. Dès lors, les bactéries vertes sont considérées comme vivantes alors que celles qui possèdent en plus une coloration rouge sont supposées mortes.

Bien que ce test ait déjà été utilisé pour *C. crescentus* [47], un contrôle positif est nécessaire afin de s'assurer du bon fonctionnement du test Live/Dead®. Pour ce faire, une culture de la souche CB15N est chauffée à 80°C pendant 1 h puis observée en microscopie à fluorescence. Toutes les bactéries sont marquées en rouge, indiquant qu'elles sont toutes mortes. (Fig. 8B). (Résultat généré par E. Lawarée).

La souche CB15N a été cultivée dans un milieu HIGG sans cuivre additionné de différentes concentrations de  $\text{CuSO}_4$ . Après 8 h d'exposition au cuivre, les bactéries ont été soumises au test Live/Dead®.

Les résultats ne montrent pas de mortalité cellulaire accrue après 8 h et 24 h, quelque soit la concentration en cuivre testée (Fig. 8A et 8B). Cette absence de mortalité suggère que l'exposition au cuivre inhibe la croissance cellulaire, sans pour autant tuer les cellules.

**A. 1**

Sequences producing significant alignments:

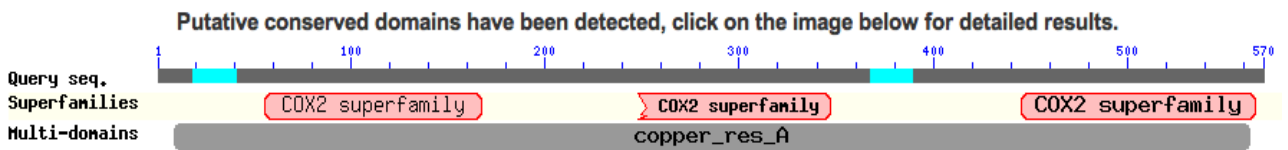
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
NP_419780.1	copper-binding protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_00251	115	115	99%	1e-29
NP_421280.1	hypothetical protein CC_2477 [Caulobacter crescentus CB15] >ref Y	28.5	28.5	17%	0.027

**2**

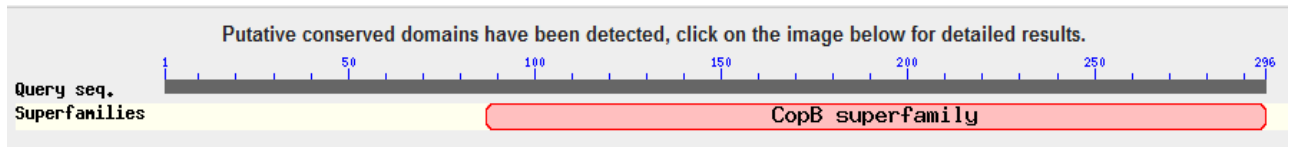
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
NP_419781.1	copper-binding protein [Caulobacter crescentus CB15] >ref YP_00251	127	127	85%	8e-37
NP_420047.1	hypothetical protein CC_1233 [Caulobacter crescentus CB15] >qb AAI	27.7	27.7	34%	0.014

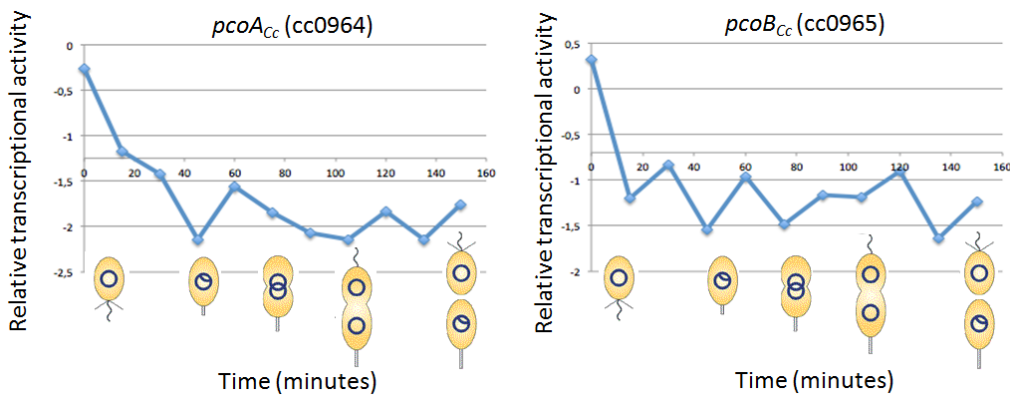
**B. 1**



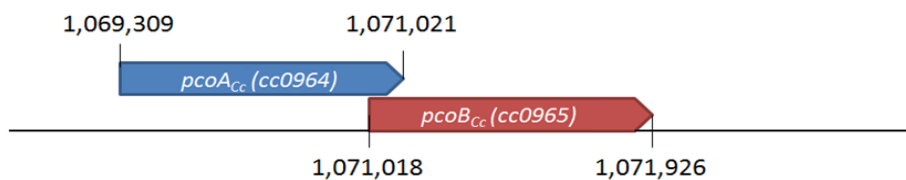
**2**



**C. 1**



**D.**



**Fig. 9 : Résultats des analyses bioinformatiques.** **A. 1)** Résultats du *blast* pour la séquence *cueO* d'*E. coli* chez *C. crescentus*. (Pubmed blast) **A. 2)** Résultats du *blast* pour la séquence *pcoB* d'*E. coli* chez *C. crescentus*. (Pubmed blast) **B. 1)** Prédiction de domaines pour *PcoA<sub>Cc</sub>*. (Pubmed blast) **B. 2)** Prédiction de domaines pour *PcoB<sub>Cc</sub>*. (Pubmed blast) **C.** Analyse transcriptomique des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* (gauche) et *pcoB<sub>Cc</sub>* (droite) au cours du cycle cellulaire (expérience faite en M2G). L'axe vertical est l'activité transcriptionnelle relative, et l'axe horizontal est le temps en minutes [45]. **D.** Position génomique des deux gènes et représentation du chevauchement de 4 nucléotides entre ces deux mêmes gènes (Biocyc)

## 2) Des homologues de systèmes de régulation du cuivre d'*E. coli* sont présents chez *C. crescentus*

Comme mentionné dans l'introduction, l'homéostasie du cuivre a été étudiée de manière intensive chez *E. coli* [24][25][26][27]. L'intérêt de ce mémoire étant d'étudier l'impact du cuivre sur le cycle cellulaire, une analyse comparative *in silico* a été réalisée dans un premier temps afin d'identifier chez *C. crescentus* des homologues des acteurs de la résistance au cuivre préalablement identifiés chez *E. coli*.

A cette fin nous avons réalisé une analyse bioinformatique en comparant les séquences des différentes protéines impliquées dans la résistance au cuivre chez *E. coli* au protéome de *C. crescentus*. De nombreux homologues ont été identifiés chez *C. crescentus* (Annexe A). Parmi ces candidats potentiels, nous avons décidé de déterminer si Cc0964 (PcoA<sub>Cc</sub>) et Cc0965 (PcoB<sub>Cc</sub>), respectivement homologues des multicopper oxydases "PcoA/CueO" et "PcoB" d'*E. coli* (Fig. 9A), étaient impliqués dans l'homéostasie du cuivre chez *C. crescentus*.

De manière intéressante, *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* sont prédits et annotés comme codant pour des protéines liant le cuivre (Fig. 9A). Des analyses bioinformatiques ont, en outre, suggéré que, si aucune des deux protéines ne possédait de domaine transmembranaire, PcoA<sub>Cc</sub> contenait tout de même un signal TAT, suggérant que cette protéine peut traverser la membrane interne pour se retrouver dans le périplasme.

Une analyse transcriptomique globale réalisée au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus* révèle que l'expression transcriptionnelle de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* varie au cours du cycle cellulaire [39]. Si cette observation est validée par qRT-PCR, elle ajoutera de l'intérêt à l'étude de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* en suggérant une relation entre la résistance au cuivre et le cycle cellulaire (Fig. 9C). La transcription de ces gènes ne semble toutefois pas régulée directement par CtrA. En effet, aucune boîte CtrA n'a été trouvée au niveau du promoteur de ces gènes [38][45].

Enfin, il est à noter que *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* sont organisés en opéron mais se chevauchent toutefois de 4 nucléotides, le RBS de *pcoB<sub>Cc</sub>* étant donc localisé dans la région 3' de *pcoA<sub>Cc</sub>* (Fig. 9D).



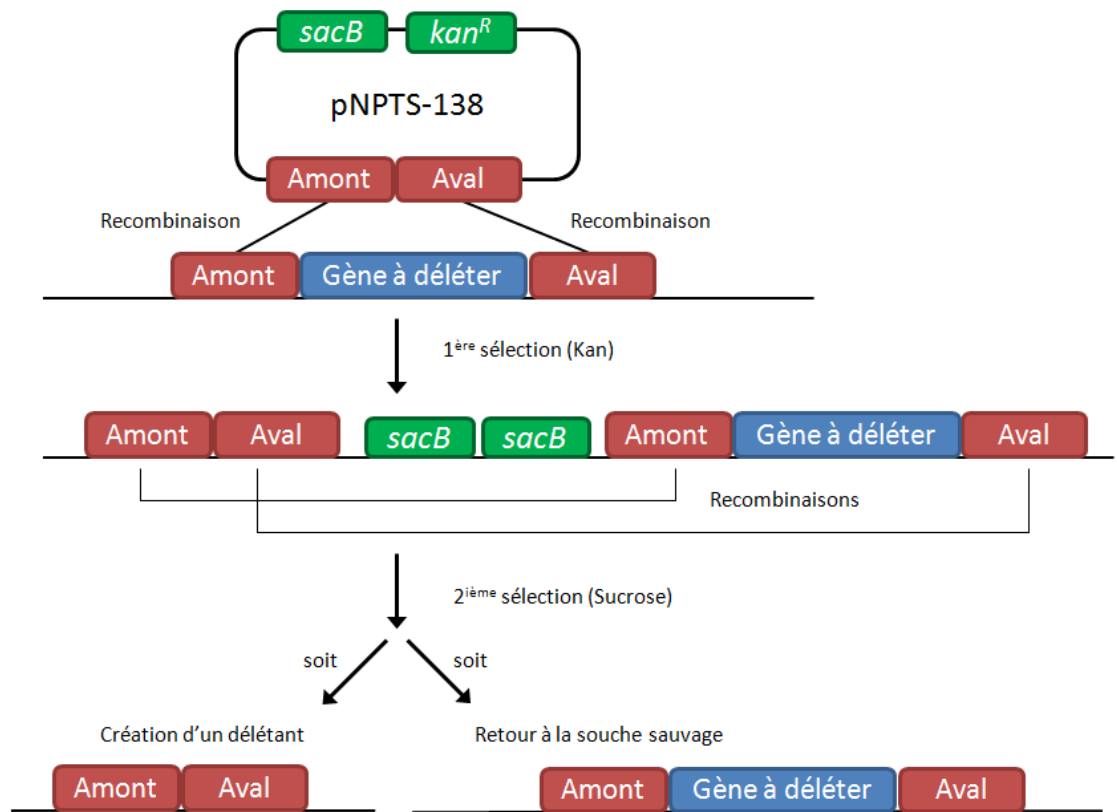


Fig. 10 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour la délétion des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*.

### 3) Constructions de souches délétantes et marquées au locus

Afin de caractériser le rôle de PcoA<sub>Cc</sub> et de PcoB<sub>Cc</sub> dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre chez *C. crescentus*, une souche double délétante pour les gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>* a été construite.

Afin de s'assurer que les effets éventuellement observés résultent de la délétion de l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>*, et non d'un effet polaire, une complémentation a été réalisée. La complémentation s'est faite en transformant cette souche délétante avec un plasmide *low-copy* non-intégratif pMR10 contenant une version fonctionnelle des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*. Ces deux gènes sont placés sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ* présent sur le plasmide.

La souche délétante pour les deux gènes (CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>*) ainsi que la version complémentée (CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>*) que nous avons utilisées ont été réalisées par S. Leblastier dans le cadre de sa thèse.

Des souches délétantes pour chacun ces deux gènes (CB15NΔ*pcoA<sub>Cc</sub>* et CB15NΔ*pcoB<sub>Cc</sub>*) ont été construites par la technique du remplacement allélique. Les deux délétants propres sont obtenus chacun grâce à deux mécanismes de recombinaison distincts. Pour ce faire, un plasmide intégratif comportant un marqueur de sélection Kan et de contre-sélection SacB doit porter les régions amont et aval (500 pb chacune) de la séquence à déléter. (Fig. 10)

La première recombinaison se passe entre l'une des régions bordant le gène d'intérêt et la région bordante (amont ou aval) correspondante, précédemment clonée dans le vecteur intégratif. Afin de sélectionner les clones qui ont intégré le plasmide par cette première recombinaison, ceux-ci sont sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine, et ensuite remis en culture dans un milieu riche (PYE), mais sans antibiotique. Le second évènement de recombinaison, rendu possible par cette absence de pression de sélection, conduira soit à l'excision du plasmide intégratif et de la séquence du gène à déléter, soit à la reconstitution de la souche sauvage. Les clones ayant perdu le plasmide sont sélectionnés sur un milieu PYE contenant du sucrose. Seuls les clones ayant perdu le plasmide, et donc le gène de sacB, conférant une sensibilité au sucrose, peuvent pousser. L'étape finale consistera à contrôler l'élimination du gène d'intérêt au moyen d'un crible PCR sur colonies à l'aide d'amorces s'hybridant 700 paires de base de part et d'autre des gènes à déléter.



1. Construction du vecteur intégratif comportant les régions flanquantes des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*

Les régions « amont » et « aval » bordant *pcoA<sub>Cc</sub>* ou *pcoB<sub>Cc</sub>* sont amplifiées par PCR via des amorces contenant chacune un site de restriction bien précis. Ensuite, les régions sont respectivement restreintes par Sall/EcoRI et EcoRI/HindIII pour *pcoA<sub>Cc</sub>* ou EcoRI/XbaI et XbaI/HindIII pour *pcoB<sub>Cc</sub>*. Une triple ligation de ces deux régions dans un plasmide intégratif nommé pNPTS138 (restreint préalablement par Sall/HindIII ou EcoRI/HindIII) est effectuée.

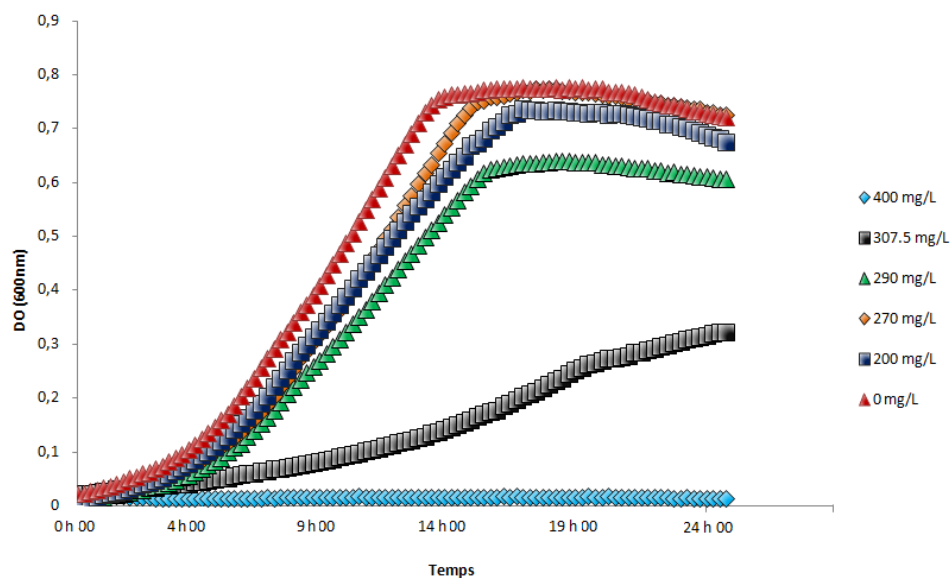
2. Délétion des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*

Le plasmide intégratif pNPTS138 contenant les régions « amont » et « aval » bordant *pcoA<sub>Cc</sub>* ou *pcoB<sub>Cc</sub>* est transformé dans la souche CB15N. La double sélection kanamycine/sucrose permet l'excision du plasmide ainsi que du gène *pcoA<sub>Cc</sub>* ou *pcoB<sub>Cc</sub>*. Les clones sont ensuite contrôlés par une PCR diagnostique sur colonie. L'obtention des produits PCR de 1400 paires de base permet de vérifier qu'il s'agit bien de la souche délétante (nommée CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>* ou CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>*).

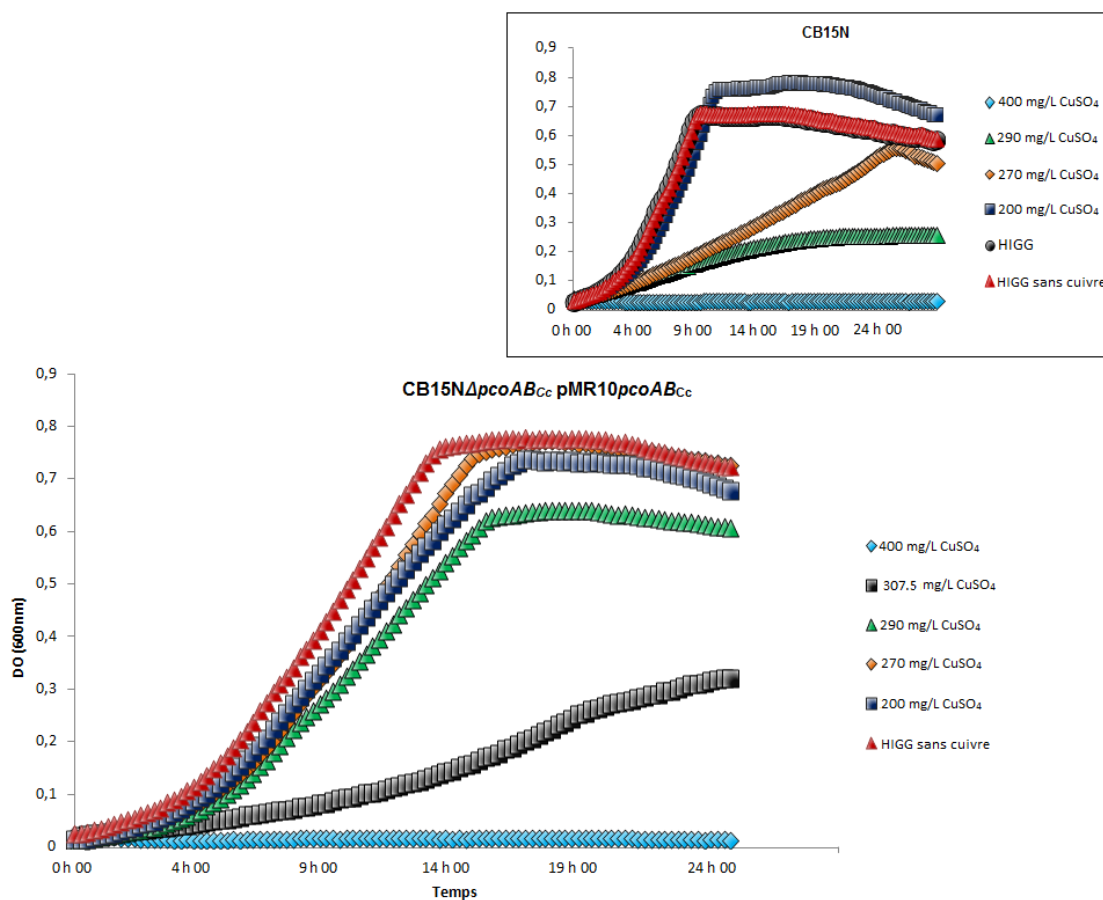
Cependant, ces souches ont été construites avant de constater que les deux gènes se chevauchent de quelques paires de bases, et se sont donc révélés être toutes deux des doubles délétantes, puisque la délétion sectionnait systématiquement à la fois la fin de *pcoA<sub>Cc</sub>* et le début de *pcoB<sub>Cc</sub>*. Ces constructions génétiques n'ont donc pas été utilisées.

D'autres constructions génétiques ont été réalisées, notamment à des fins de localisation protéique. Ne possédant pas d'anticorps contre PcoB, une fusion au locus 3-Flag en 3' de *pcoB<sub>Cc</sub>* a été effectuée (souche CB15N *pcoB<sub>Cc</sub>-3Flag*). Cette fusion a été réalisée sur le même principe de remplacement allélique qu'utilisé pour la création d'un délétant propre. Cependant, le gène n'est pas délété mais bien remplacé par une version marquée, un 3-Flag étant inclus dans l'amorce s'hybridant en aval du gène.

La souche CB15N *pcoA<sub>Cc</sub>-His* a également été construite de manière à obtenir PcoA<sub>Cc</sub> fusionné à un tag His à l'extrémité 3' du gène. De part la présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale de PcoA<sub>Cc</sub> et le chevauchement de *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*, une fusion au locus était plus complexe à mettre en place. *pcoA<sub>Cc</sub>-His* a donc été cloné dans le plasmide pMR10, sous le contrôle de son propre promoteur, et introduit dans la souche CB15N.



**Fig. 11: Courbes de croissance pour la souche CB15NΔpcoAB<sub>cc</sub> cultivée en HIGG avec différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>.** La souche CB15NΔpcoAB<sub>cc</sub> a été cultivée en HIGG (courbe **noire**), HIGG sans cuivre (courbe **Rouge**), ainsi en HIGG sans cuivre supplémentée par 0,2, 1, ou 15 mg/L de CuSO<sub>4</sub> (respectivement les courbes **mauve**, **verte** et **orange**). La densité optique <sub>600nm</sub> a été mesurée toutes les 15 min.



**Fig. 12: Courbes de croissance pour la souche CB15NΔpcoAB<sub>cc</sub> pMR10pcoAB<sub>cc</sub> en HIGG avec différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>.** La souche CB15NΔpcoAB<sub>cc</sub> pMR10pcoAB<sub>cc</sub> a été cultivée en HIGG sans cuivre (courbe **Rouge**), ainsi en HIGG sans cuivre supplémentée par 200, 270, 290, 307,5 ou 400 mg/L de CuSO<sub>4</sub> (respectivement les courbes **bleu foncée**, **orange**, **verte**, **noire** et **bleu claire**). La densité optique <sub>600nm</sub> a été mesurée toutes les 15 min. Le cadre en haut à droite est un rappel des courbes de croissance de la CB15N cultivée dans les mêmes conditions de cuivre.

#### 4) La souche double délétante CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* montre une sensibilité au cuivre accrue

Après avoir déterminé la sensibilité au cuivre de la souche sauvage, une caractérisation similaire a été effectuée dans la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>*.

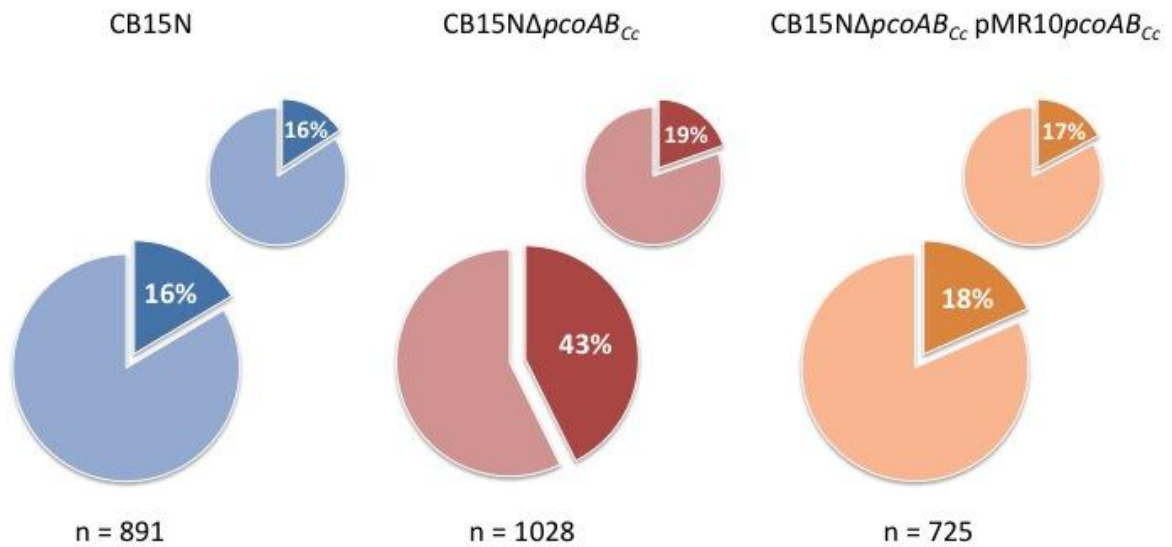
##### A. Une résistance au cuivre diminuée

Le but de cette expérience est de démontrer l'impact du cuivre sur la croissance de la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>*. Pour ce faire, cette souche a été cultivée pendant 24 h dans un milieu dépourvu de cuivre (HIGG sans cuivre), additionné de différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. Une mesure de la densité optique (D.O.<sub>600nm</sub>) a été réalisée toutes les 15 min.

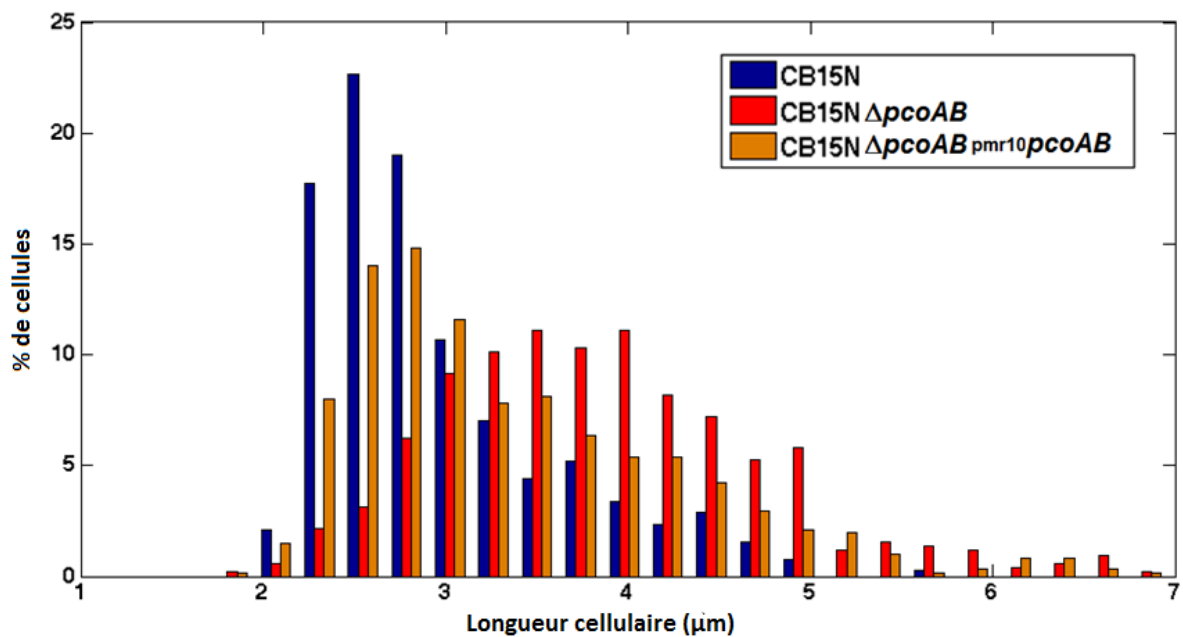
Dans l'hypothèse d'une plus grande sensibilité de la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* au cuivre, une large gamme de concentrations de CuSO<sub>4</sub> a donc été évaluée. De manière intéressante, il semble que CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* ne croît de manière normale que si la concentration de CuSO<sub>4</sub> est inférieure à 1 mg/L (Fig. 11). Au delà de ce seuil, la capacité de croissance chute fortement, indiquant une sensibilité au cuivre accrue de la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* (Fig. 11).

De manière à s'assurer que la sensibilité accrue de la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* résulte bien de la délétion de l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>* et non d'un effet polaire, la souche complétée CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* a également été caractérisée (Fig. 12). La souche complétée CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* est nettement plus résistante au cuivre que la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* et dépasse même les capacités de résistance au cuivre de la souche sauvage. En effet, CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* croit encore en présence de 290 mg/L de CuSO<sub>4</sub> alors que le seuil maximal de croissance pour la CB15N est de 250 mg/L (Fig. 12). Cette meilleure résistance est probablement liée au fait que les deux gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*, présents sur le plasmide pMR10 et par ailleurs sous le contrôle du promoteur fort du gène *lacZ*, sont par conséquent surexprimés. Dès lors, il semble que cette surexpression de *pcoAB<sub>Cc</sub>* procure une meilleure résistance au stress au cuivre. La construction d'une souche complétée sous le contrôle du promoteur endogène de l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>* est en cours de réalisation.

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres composés cuivrés tels que le CuCl<sub>2</sub> et le Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.



**Fig. 13 : Graphiques comparant l'abondance des cellules prédivisionnelles pour les trois souches après 0 h et 8 h.** Graphique établi par un comptage cellulaire de photos prises en microscopie à contraste de phase. Le nombre de cellules prédivisionnelles est représenté par le quartier foncé, indiqué par un pourcentage, par rapport à la population totale. Le petit graphique en haut à droite représente l'abondance des cellules prédivisionnelles au temps 0 h, le grand représente le temps 8 h. La souche CB15N est représentée en **bleu**, la CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> est en **rouge** et la souche CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> pMR10pcoAB<sub>Cc</sub> en **orange**. "n" est le nombre total de cellules comptées



**Fig. 14 : Graphique de comparaison de la taille cellulaire bactérienne.** Graphique montrant la distribution de taille pour les trois souches CB15N (en **bleu**), CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> (en **rouge**) et CB15NΔpcoAB<sub>Cc</sub> pMR10pcoAB<sub>Cc</sub> (en **orange**). (Matlab)

## A. Une accumulation de cellules prédivisionnelles lors d'un stress au cuivre

De manière semblable à ce qui a été fait pour la souche CB15N, des observations au microscope à contraste de phase ont été réalisées sur les souches CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* et CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* dans le but de déterminer l'impact du cuivre sur la morphologie de ces souches.

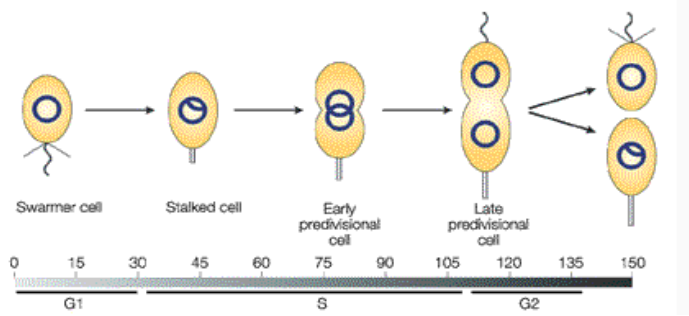
La souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* et CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* ont donc été cultivées pendant 8 h dans un milieu contenant différentes concentrations de CuSO<sub>4</sub>. Les concentrations en CuSO<sub>4</sub> testées varient de 0 à 20 mg/L pour la souche délétante et jusqu'à 400 mg/L pour la version complétée. A nouveau, les « pads » d'agarose sur lesquels les échantillons prélevés ont été déposés contiennent également des concentrations similaires de cuivre. Les bactéries ont ensuite été observées en microscopie à contraste de phase.

Aucune différence notable entre la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcoAB<sub>Cc</sub>* et la souche CB15N n'a pu être constatée. En revanche, nous observons une accumulation de cellules prédivisionnelles dans la souche CB15N $\Delta$ *pcoAB<sub>Cc</sub>*, cultivée pendant 8 h en présence de 20 mg/L de CuSO<sub>4</sub>, suggérant un blocage des bactéries en phase G2 de leur cycle cellulaire. (Fig. 13).

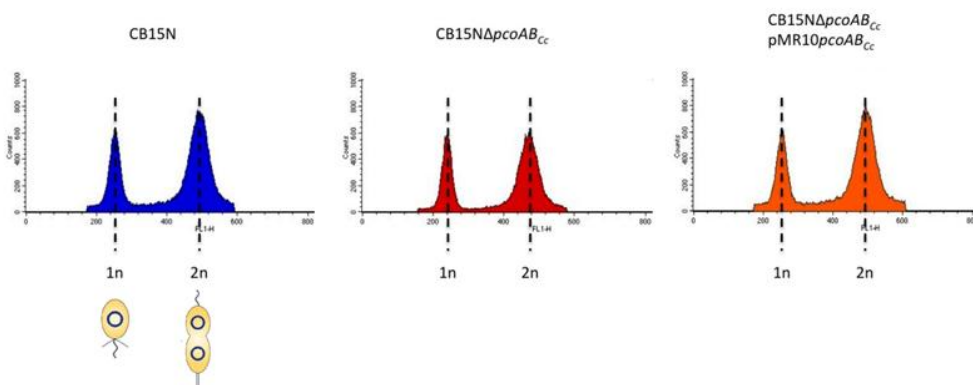
Une mesure de la longueur des cellules au moyen du logiciel Matlab, révèle un déplacement de l'ensemble de la population bactérienne vers des tailles plus élevées, suggérant un allongement des cellules ou une accumulation de cellules prédivisionnelles (Fig. 14). De manière à éclaircir ce point, une analyse du contenu en ADN des cellules par cytométrie de flux (FACS) a été effectuée.



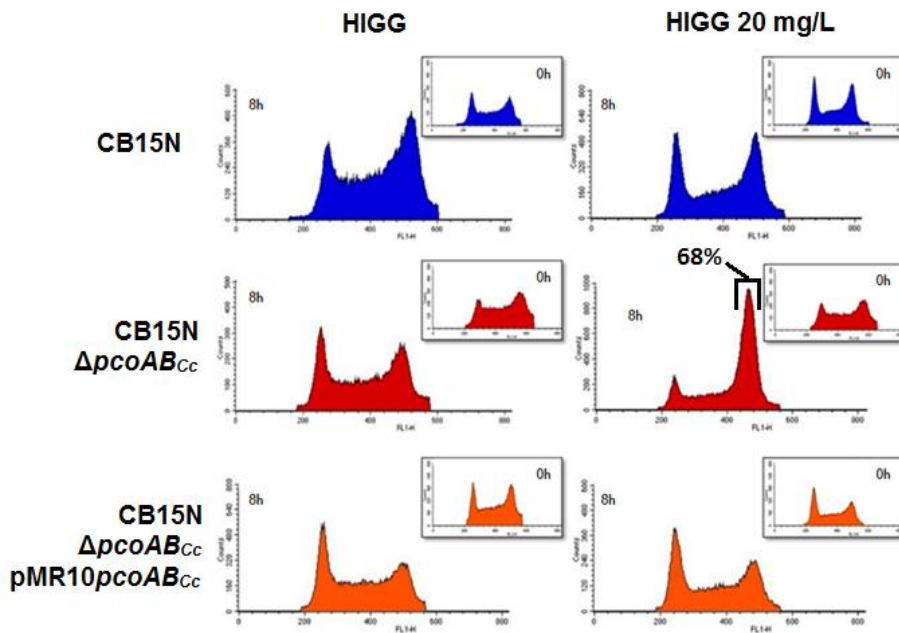
**A.**



**B.**



**C.**



**Fig. 15 : Résultats de la cytométrie de flux.** **A.** Rappel de l'évolution du cycle cellulaire de *C. crescentus* au cours du temps **B.** Contrôle rifampicine permettant de déterminer les pics 1n et 2n **C.** Résultats de l'expérience FACS, pour les trois souches au temps 0 h et 8 h, et deux conditions de cuivre (HIGG sans ajout de cuivre supplémentaire et HIGG 20 mg/L). Pour chaque condition, le graphique principal est le temps 8 h, le temps 0 h étant affiché dans le plus petit des deux cadres. Les graphiques sont établis sur base de 200000 évènements cellulaires.

## B. Analyse du contenu en ADN par cytométrie de flux

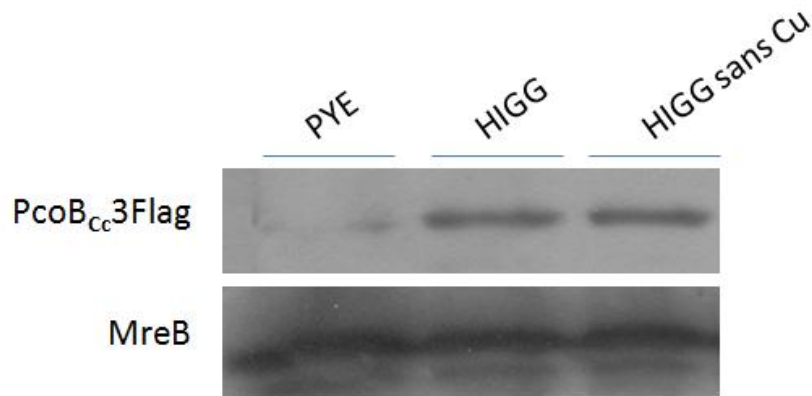
L'analyse du contenu en ADN par cytométrie de flux d'une population de bactéries exposées au cuivre permet de déterminer la proportion de bactéries possédant une quantité 1n ou 2n d'ADN, ou une quantité intermédiaire correspondant aux cellules en phase S. Une quantité 1n signifie qu'une bactérie est en phase G1, soit sous forme flagellée, soit sous forme pédonculée. Une quantité 2n signifie que la bactérie est en phase G2, donc au stade prédivisionnel.

La quantité d'ADN est mesurée grâce à un marquage du matériel génétique au Sytox Green®. Ce composé fluorescent se lie à l'ADN de la cellule. Dès lors, la fluorescence apparaît être proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans une bactérie.

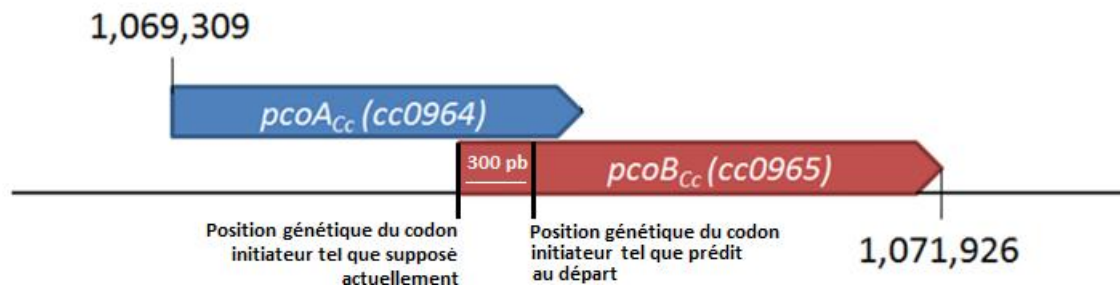
Afin de déterminer clairement les pics 1n et 2n, un contrôle est réalisé avec de la rifampicine, un antibiotique à large spectre qui inhibe l'ARN polymérase ADN-dépendante[48]. Par conséquent, les bactéries ne possédant qu'un (1n) ou deux (2n) chromosomes sont dites « figées » alors que les bactéries en phase S continueront la réplication de l'ADN jusqu'à l'obtention de deux chromosomes. (Fig. 15A)

Afin de déterminer s'il y a bien une accumulation de cellules présentant deux chromosomes, les trois souches (CB15N, CB15N $\Delta$ *pcxAB<sub>Cc</sub>* et CB15N $\Delta$ *pcxAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcxAB<sub>Cc</sub>*) ont été analysées par cytométrie de flux, après 0 et 8 h de croissance dans un milieu HIGG contenant 20mg/L de CuSO<sub>4</sub>. (Fig. 15B)

Après 8 h de culture en HIGG supplémenté de 20 mg/L de CuSO<sub>4</sub>, le contenu chromosomique de la souche CB15N ne varie pas. En revanche, nous observons une accumulation de cellules 2n (68%) pour la souche CB15N $\Delta$ *pcxAB<sub>Cc</sub>* cultivée dans les mêmes conditions, renforçant dès lors les observations microscopiques. Enfin, aucune modification du contenu en ADN de la souche CB15N $\Delta$ *pcxAB<sub>Cc</sub>* pMR10*pcxAB<sub>Cc</sub>* n'a pu être mise en évidence. (Fig. 15B)



**Fig. 16: Mesure de l'abondance protéique de PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag par western blot.** La souche CB15N PcoBCc-3Flag a été cultivée dans trois milieux distincts : PYE (milieu riche), HIGG (milieu pauvre défini) et HIGG sans cuivre (milieu pauvre défini sans cuivre). Un anticorps primaire anti-Flag suivi d'un anticorps secondaire sont utilisés pour révéler la présence de PcoB<sub>Cc</sub>3Flag. On constate que la protéine PcoB<sub>Cc</sub>3Flag est plus abondante lorsque les bactéries sont cultivées en HIGG et HIGG sans cuivre que en PYE. Un contrôle de charge MreB dans trois milieux différents (PYE, HIGG, HIGG dépourvu de cuivre) a été effectué.



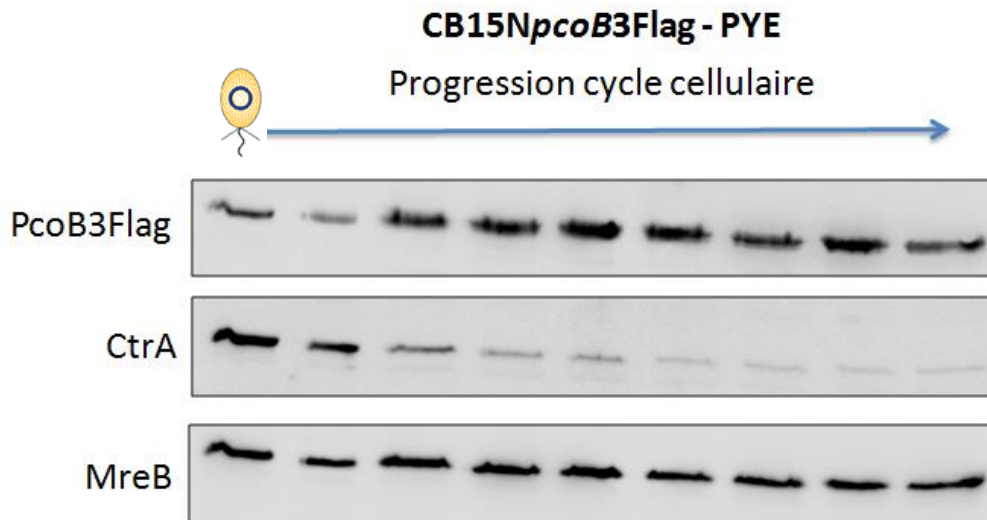
**Fig. 17 : Représentation schématique de la position des gènes *pcoA<sub>Cc</sub>* (gauche) et *pcoB<sub>Cc</sub>* (droite).** La position génomique prédite du codon initiateur de *pcoB<sub>Cc</sub>* semble incorrecte. Après recherche, un autre codon initiateur a été trouvé dans la séquence de l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>*, quelques 300 pb en amont de l'ATG initialement prédit.

## 5) L'abondance protéique de PcoB<sub>Cc</sub>3Flag varie au cours du cycle cellulaire.

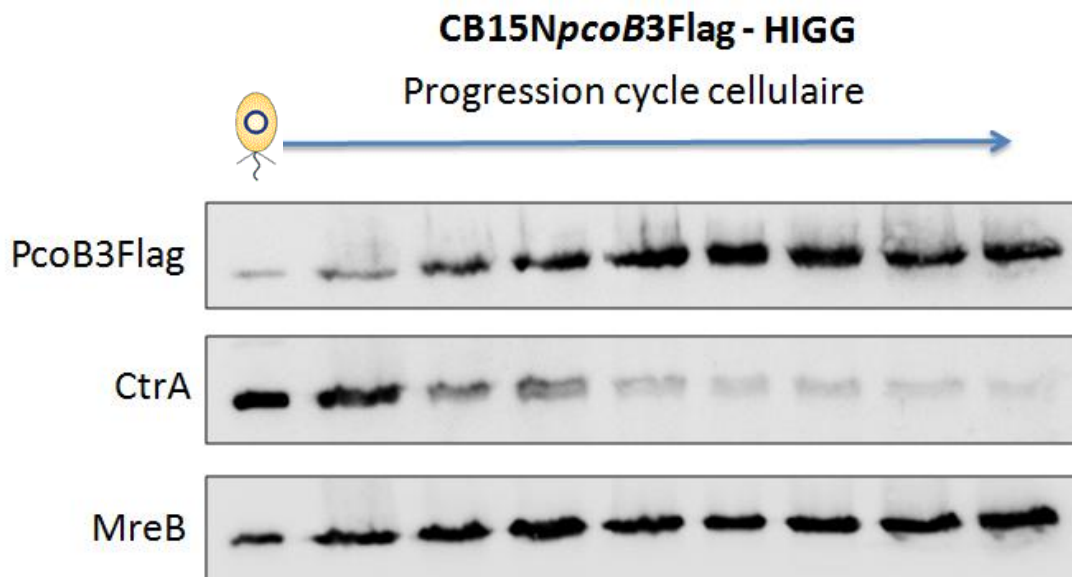
Afin d'évaluer la quantité de PcoB<sub>Cc</sub> chez *C. crescentus* à différents stades du cycle cellulaire, le gène chromosomique *pcoB<sub>Cc</sub>* a été fusionné en 3' à un tag 3-Flag de manière à pouvoir visualiser PcoB<sub>Cc</sub> par *western blot*. Les échantillons ont été cultivés dans trois milieux de culture différents : PYE, HIGG, et HIGG dépourvu de cuivre. La présence de bandes protéiques dans ces trois conditions (Fig. 16) indique que la protéine PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag est bien traduite et, qu'a priori, cette dernière est stable. Cependant, la quantité de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag semble être différente entre les milieux. Il semble plus abondant en HIGG et HIGG sans cuivre qu'en PYE. Un contrôle de charge par la mesure d'abondance de MreB a été effectué afin de s'assurer que les échantillons soient comparables. Ils devraient contenir une quantité totale de protéines équivalente, afin de ne pas créer artificiellement de différences entre les échantillons ou les conditions. (Fig. 16).

Il est également à noter que la bande protéique obtenue se situe plus haut que prévu, ce qui indique *a priori* un poids moléculaire plus grand que prédit. Deux hypothèses peuvent être formulées à ce sujet. Premièrement, la liaison des protéines PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag à des atomes de cuivre pourrait entraver la migration ou alourdir la protéine. Même si cette hypothèse ne peut être écartée, le fait de retrouver le même profil de migration dans la condition supposée sans cuivre, et le fait d'être en condition dénaturante rend cette hypothèse discutable. La deuxième hypothèse est que PcoB<sub>Cc</sub> est en fait plus grand que sa taille prédite. Après vérification de la séquence nucléotidique, il apparaît qu'un codon ATG se situe 300 paires de base en amont du codon de départ envisagé jusqu'ici. (Fig. 17) En considérant cet ATG comme le codon initiateur de PcoB<sub>Cc</sub>, la taille de la protéine correspondrait au poids moléculaire indiqué par la migration du *western blot*.

**A.**



**B.**



**Fig. 18 : Mesure de l'abondance protéique de PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag par western blot au cours du cycle cellulaire.** La souche CB15N PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag a été cultivée dans deux milieux distincts : **A.** PYE (milieu riche) et **B.** HIGG (milieu pauvre défini). Un anticorps primaire anti-Flag suivi d'un anticorps secondaire sont utilisés pour révéler la présence de PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag. Un contrôle de charge MreB ainsi qu'un contrôle de la progression du cycle cellulaire dans les deux milieux différents (PYE, HIGG) ont été effectués.

La fusion PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag montre que la protéine est belle et bien produite. Nous avons ensuite analysé son abondance protéique au cours du cycle cellulaire. Pour ce faire, les bactéries ont été cultivées en PYE *overnight* puis lavées, resuspendues dans le milieu adéquat le lendemain et remises à 30°C sous agitation *overnight*. Par la suite, une synchronisation de la population bactérienne a été réalisée, permettant ainsi d'isoler les cellules flagellées et de pouvoir mesurer l'abondance de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag d'une population synchronisée. Des échantillons protéiques ont été prélevés toutes les 15 (PYE) ou 25 (HIGG) minutes jusqu'à la fin du cycle cellulaire. (Fig. 18A et 18B)

Les résultats de ce *Western Blot* montrent une variation de l'abondance de PcoB<sub>Cc</sub>-3 Flag au cours du cycle cellulaire. La protéine semble s'accumuler au fur et à mesure du cycle, augmentant graduellement de la phase S jusqu'en phase G2 (Fig. 18). Il est à noter que cette observation ne corrèle pas avec l'hypothèse précédemment formulée qui supposait que la protéine était plus exprimée en HIGG, à cause de la présence accrue de cellule flagellées. Le contrôle MreB indique une charge équivalente de tous les échantillons (Fig. 18). L'abondance de MreB ne varie en effet pas au cours du cycle cellulaire, ce qui lui permet d'assurer ce rôle. Un second contrôle a été effectué, à savoir la mesure de l'abondance de CtrA. Ce contrôle sert estimer la progression du cycle cellulaire, et de vérifier ainsi la bonne marche de la synchronisation et de l'analyse du cycle cellulaire. CtrA est supposé plus abondant dans les cellules flagellées, au début du cycle cellulaire, diminue ensuite progressivement avant de réapparaître lorsque la cellule va entrer en division. Cependant, nous pouvons voir sur le contrôle que CtrA n'a pas le temps de revenir à son niveau d'expression initial, ce qui signifie sans doute que le cycle cellulaire n'est pas complètement terminé (Fig. 18)

Nous avons également tenté de réaliser une expérience similaire avec la souche CB15N *pcoA<sub>Cc</sub>-His*. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à visualiser la protéine fusion. Soit cette dernière n'est pas fonctionnelle avec le tag His, soit le promoteur n'induit pas correctement la transcription.



## **Discussions et perspectives**





## Discussions et perspectives

Les objectifs de ce mémoire étaient de voir si le cuivre à la capacité d'impacter le cycle cellulaire de *C. crescentus* comme d'autres métaux peuvent le faire chez d'autres bactéries, et de déterminer si *C. crescentus* possède un système de régulation de l'homéostasie du cuivre. Les différentes expériences menées durant ce mémoire ont permis d'apporter quelques pistes de réponses à ces interrogations. La souche mutée pour deux gènes candidats (*pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*) prédits pour être impliqués dans la résistance au cuivre montre en effet une sensibilité accrue à cet oligo-élément. De plus, il semble que le cuivre entraîne chez *C. crescentus*, directement ou indirectement, une accumulation de cellules prédivisionnelles, comme le montre les observations en microscopie. La cytométrie de flux indique elle aussi une accumulation de cellules possédant une quantité 2n d'ADN. Ces résultats suggèrent un blocage en fin de cycle cellulaire, en phase G2. De plus, le cuivre semble capable d'induire des modifications morphologiques réversibles.

### 1) *pcoA<sub>Cc</sub>* et *pcoB<sub>Cc</sub>*, acteurs d'une homéostasie fine et efficace du cuivre

Il ressort des mises au point effectuées sur la CB15N que les mécanismes d'homéostasie du cuivre semblent efficaces, et finement régulés. Efficaces, car ils confèrent à la bactérie une résistance importante aux stress au cuivre. Les résultats obtenus montrent que la CB15N peut croître normalement jusqu'à 250 mg/L de CuSO<sub>4</sub>. A titre de comparaison, la plupart des souches de *Pseudomonas syringae* ne tolèrent que 200 mg/L de cuivre au maximum [49]. *E. coli*, elle, est plus résistante et supporte jusqu'à 1500 mg/L de cuivre [50]. Ces mécanismes semblent également finement régulés, car les courbes de croissance générées montrent qu'une faible variation de la concentration en cuivre peut entraîner des effets importants sur la croissance cellulaire. De plus, il est intéressant de constater que, même aux plus hautes concentrations en cuivre, les bactéries ne meurent pas, mais que leur cycle de division est arrêté.

### 2) Fonctions de *PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>* et hypothèses

Les courbes de croissances semblent donc indiquer une sensibilité accrue du mutant CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>*. Cette souche est incapable de croître en présence lorsque le seuil de 20 mg/L de CuSO<sub>4</sub> est atteint, alors que la souche sauvage peut encore croître passé 250 mg/L. La souche complémentée retrouve par contre une résistance similaire à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent une implication spécifique de l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>* dans la résistance au cuivre.

Une des grandes perspectives de ce travail est de comprendre plus en détails le fonctionnement des protéines *PcoA<sub>Cc</sub>* et *PcoB<sub>Cc</sub>* dans l'homéostasie intracellulaire du cuivre. Pour ce faire, il est nécessaire, entre autres, d'obtenir les souches délétantes pour chacun de ces gènes individuellement. La construction de ces souches est actuellement en cours, et il sera indispensable de vérifier la fonctionnalité de chacun des gènes avant d'entamer la caractérisation des mutants. La caractérisation de ces souches permettra peut-être de déterminer si l'action d'une des deux protéines est prédominante par rapport à l'autre ou au contraire plus négligeable.



Il serait également intéressant de pousser plus loin la caractérisation des souches marquées avec le 3-Flag ou l'His-Tag. La souche CB15N pMR10 *pcoA<sub>Cc</sub>*His pourrait être synchronisée et l'abondance de la protéine PcoA<sub>Cc</sub> détectée par *Western Blot*. Les deux souches marquées pourraient également être utilisées à des fins de localisation cellulaire par immunofluorescence ou par fractionnement cellulaire. Alors que la microscopie à fluorescence donne des informations topologiques, le fractionnement permet de voir dans quels compartiments cellulaires les protéines localisent, et si ces deux protéines co-localisent. En effet, les analyses bioinformatiques prédisent que seul PcoA<sub>Cc</sub> possède un signal TAT, et il serait intéressant de voir si PcoB<sub>Cc</sub> s'y associe pour traverser la membrane du périplasme. Ces expériences permettraient donc d'établir un modèle de fonctionnement de ce système de régulation homéostatique.

Afin de confirmer ou d'infirmier les résultats obtenu par Mike Laub lors de son analyse transcriptomique globale, une qRT-PCR sur des ARNm issus de bactéries cultivées en PYE et en HIGG pourrait être réalisée.

Il serait tout aussi pertinent de caractériser d'autres gènes prédits comme étant impliqués dans la résistance au cuivre. En effet, la liste des gènes candidats prédits par les analyses bioinformatiques ne s'arrête pas à l'opéron *pcoAB<sub>Cc</sub>*. Si ces deux gènes semblent avoir un rôle capital dans l'homéostasie du cuivre (réduisant la résistance au cuivre de *C. crescentus* de plus de 100 fois), d'autres gènes étant plus que probablement impliqués dans l'homéostasie de cet oligo-élément.

### 3) Effets du cuivre sur le cycle cellulaire et la morphologie

#### A. Le cuivre entraine une accumulation de cellule prédivisionnelles.

On observe en effet une accumulation de cellules prédivisionnelles, supposée bloquées en phase G2 du cycle cellulaire, de CB15NΔ*pcoAB<sub>Cc</sub>* lorsque cette souche exposée à une concentration en cuivre supérieure à 20 mg/L.

Une hypothèse est que cet arrêt du cycle cellulaire pourrait être dû aux dommages causés par les ROS et le peroxyde d'hydrogène. Les stress oxydatifs peuvent endommager les systèmes de division cellulaire, ou l'ADN. Il a été montré que des dégâts à l'ADN pouvaient retarder la division cellulaire, le temps que la machinerie de réparation corrige ces dommages avant que la bactérie n'entame un nouveau cycle cellulaire [51].

Les résultats de *western blots* montrent que PcoB<sub>Cc</sub>-3Flag tend à s'accumuler dans les cellules pédonculées puis prédivisionnelles, ce qui suggère qu'il peut posséder un rôle important dans ces formes cellulaires. Cette accumulation de protéines qui semblent impliquées dans la régulation du cuivre pourrait indiquer une homéostasie plus efficace dans la forme pédonculée. Si cette dernière résiste effectivement mieux au cuivre, alors il se pourrait que le blocage en G2 soit un mécanisme de protection évolutivement acquis, spécifique du cuivre.

Cette adaptation pourrait s'expliquer par le fait que la cellule pédonculée est fixée, contrairement à la cellule flagellée qui est en mesure de fuir le stress causé par un excès de cuivre. Puisqu'elle ne possède pas la deuxième option du dilemme "Fight or flight" posé par les stress extérieurs, la cellule pédonculée s'est peut-être adaptée en acquérant une meilleure



résistance. Dès lors, l'absence de PcoABCc poserait problème. Le blocage apparent en G2 pourrait être dû à un retard dans la division cellulaire, la cellule étant en attente de meilleures conditions environnementales, ou dû à des dommages oxydatifs, dont l'occurrence est augmentée par l'absence de ces mécanismes de régulation.

Pour tester cette hypothèse, Il serait intéressant de voir si cet arrêt du cycle cellulaire peut-être obtenu à partir d'autres oligo-éléments, comme le fer, capable de déclencher la réaction de Fenton [52]. Des courbes de croissances et de la cytométrie de flux pourraient être réalisées, en ajoutant dans un milieu de culture standard de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou d'autres oxydants, ou au contraire des anti-oxydants. Ces expériences pourraient permettre de déterminer si l'accumulation de cellules prédivisionnelles et les autres observations réalisées sont imputable aux stress oxydatifs ou non.

## B. Le cuivre affecte la morphologie de la cellule

Dans les résultats de microscopie, nous remarquons que, lorsque la concentration de CuSO<sub>4</sub> dépasse les 270 mg/L, la morphologie de la CB15N est affectée. Il en résulte des gonflements cellulaires, ou "lemon shapes".

L'hypothèse la plus directe pour expliquer ce gonflement est de supposer un problème d'osmolarité. En saturant le système d'évacuation du cuivre, ce dernier se retrouverait dépassé et permettrait l'entrée en masse de cuivre dans la cellule, suivi d'un flux d'eau entrant par osmose et causant un gonflement de la bactérie. Cependant, cette hypothèse semble pouvoir être écartée. Tout d'abord, parce que les "lemon shapes" peuvent également être observées lorsque le milieu lui-même contient une grande concentration de cuivre. Dès lors, les bactéries se retrouvent en environnement hypertonique, et non hypotonique. Ensuite, les bactéries gram-négatives tels que *C. crescentus* sont généralement considérées comme morphologiquement résistantes aux chocs osmotiques [53]. Enfin, des expériences ont montré que la CB15N ne semble pas osmotiquement impactée par des excès de NaCl, MgSO<sub>4</sub> ou de sucrose [Thèse d'Emeline Lawarée].

Cette hypothèse écartée, il est encore une fois pertinent de se demander si les effets sur la morphologie de *C. crescentus* observés sont spécifiques du cuivre ou non, et s'ils sont directs ou indirects. Des études ont montrés des phénotypes identiques (gonflement cellulaire) lorsque la localisation de MreB était altérée, par exemple au moyen de composés chimiques ou de mutations génétiques [54][55][56]. MreB régissant la morphologie cellulaire, son altération par des dégâts oxydatifs pourrait expliquer l'impact phénotypique des hautes concentrations de cuivre sur les bactéries. De plus MreB est décrit comme capable d'interrompre la ségrégation des chromosomes lorsqu'il est non fonctionnel, laissant la bactérie en phase G2 [57].

Il serait également intéressant de tester, en plus de l'effet d'oxydant, l'effet de chélateurs pour capter le cuivre libre du milieu, et d'observer l'impact que cela pourrait avoir sur les bactéries. Il n'est cependant pas aisé de trouver un chélateur efficace du cuivre qui serait assez spécifique que pour ne séquestrer que celui-ci. A nouveau, les expériences réalisées dans ce mémoire pourraient être conduites avec du fer ou des composés oxydants/anti-oxydant afin de contrôler la spécificité des effets observés. Une souche de CB15N comportant un plasmide pMR10 porteur d'un gène *mreB* couplé à la GFP, construite par Gitai *et al.*, pourrait être utilisée afin de visualiser la localisation de MreB en réponse au cuivre ou à un stress oxydatif.



Une sonde fluorescente mettant en évidence les radicaux libres oxydants pourrait être utilisée afin de contrôler l'absence de stress oxydatifs. Si les effets sont encore observés en absence de tels stress, cela indiquerait peut-être une spécificité du cuivre dans le gonflement bactérien. Ce dernier se substituerait peut-être à d'autres ions dans des enzymes chargée de maintenir la morphologie cellulaire.





# **Matériels et méthodes**



## 4. Matériels et méthodes

### I. Souches et plasmides

Souches utilisées :

Souches	Caractéristiques	Références
<b><i>Caulobacter crescentus</i></b>		
<b>CB15N</b>	Souche sauvage, mutée au niveau du Holdfast	Christine JACOBS-WAGNER
<b><i>CB15NΔpcoAB</i></b>	Souche CB15N délétante pour l'entièreté des gènes de l'opéron pcoAB.	Sophie LE BLASTIER
<b><i>CB15N pmr10 pcoAB<sub>Cc</sub></i></b>	Souche sauvage comportant un plasmide portant une copie fonctionnelle de pcoAB <sub>Cc</sub> sous contrôle du promoteur LacZ	Sophie LE BLASTIER
<b><i>CB15N pcoB3F</i></b>	Souche sauvage comprenant une fusion au locus d'un Tri-flag en C-terminal de pcoB <sub>Cc</sub>	Sébastien GILLET
<b><i>CB15N pMR10 pcoAHis</i></b>	Souche sauvage comportant un plasmide portant une copie de pcoA <sub>Cc</sub> marquée par un tag Histine	Sébastien GILLET
<b><i>Escherichia Coli</i></b>		
<b>DH10B</b>	Génotype : F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ <sup>-</sup> . Cette souche a été utilisée pour la construction de délétants.	Invitrogen
<b>S17-1</b>	Génotype : λ pir [ <i>recA thi pro hsdR- M+ RP4::2-tc::Mu::Km Tn7</i> lysogenized with λ pir phage]	Invitrogen

Plasmides utilisés :

Plasmides	Caractéristiques
<b>pSK-oriT</b>	Plasmide <i>high copy</i> et linéarisé, contenant deux promoteurs : T7 et SP6 RNA polymérase. Il possède une région MCS ainsi que le gène <i>amp</i> (codant pour une résistance à l'ampicilline) et une origine de transfert conjugatif <i>oriT</i> . Possibilité de sélection blanc/bleu grâce à la présence de <i>LacZ</i> .
<b>pNPTS138</b>	Plasmide <i>low copy</i> intégratif chez <i>C. crescentus</i> , possédant une région MCS et une origine de répllication chez <i>E. coli</i> . Ce plasmide est sélectionnable sur kanamycine et comporte un marqueur de contre-sélection ( <i>sacB</i> ) sur sucrose.
<b>pMR10</b>	Plasmide <i>low copy</i> , non-intégratif chez <i>C. crescentus</i> et possédant une région MCS. Ce plasmide est sélectionnable sur kanamycine. Possibilité de sélection blanc/bleu grâce à la présence de <i>LacZ</i> .



## II. Milieux, tampons et solutions

### A. Milieux

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

Produits	Quantité (pour 1L)
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g
NaCl	5 g
Yeast extract	5 g
Agar (si milieu solide)	15 g
H <sub>2</sub> O désionisée	1 L

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

Produits	Quantité (pour 1L)
bactopeptone	2 g
Yeast Extract	1 g
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	500 µl
Agar (si milieu solide)	15 g
H <sub>2</sub> O désionisée	998,5 ml

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

Produits	Quantité (pour 1L)
1 M Imidazole (pH 7)	5 ml
Hutner Concentrated Base*	20 ml
10% Glucose	15 ml
20% Sodium glutamate	7,5 ml
1M NH <sub>4</sub> Cl	8,9 ml
Phosphate (0,1 M)	2 ml
H <sub>2</sub> O désionisée	940 ml

\* Composition de l'Hutner concentrated base

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



\* Compostion metal « 44 » :

Produits	Quantité (pour 1L)
Disodium EDTA	2500 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10950 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5000 mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1540 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O*	392 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	248 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	177 mg
H <sub>2</sub> O	Compléter pour 1L

Pour le milieu dit "sans-cuivre", la solution « Metals 44 » ne contient pas de CuSO<sub>4</sub>. Par conséquent, ce milieu HIGG est dépourvu de source de cuivre.

## B. Antibiotiques et sucres

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

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

## C. Tampons et solutions

Solutions pour une minipréparation :

P1	P2	P3
50 mM Tris	200 mM NaOH	2,8 M d'acétate de potassium
10 mM EDTA	1% SDS	
5 g de Rnase A		
→ Mettre à pH 8		→ Mettre à pH 5,4

Solutions pour une synchronisation :

20x phosphate buffer
34,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
21,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
→ Porter à 1L avec de l'eau distillée





### Solutions pour les Western Blots :

PBS 10x (1L)	PBS Tween (1L)	SDS Page Tris-Glycine 10x (1L)	Towbin buffer (1L)
82 g de NaCl	100 ml PBS 10x	30,35 g Tris Base	5,8 g Tris Base
1,5 g KCl	500 µL de Tween	144 g Glycine	2,8 g Glycine
14,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		10 g SDS	0,37 g SDS
2,72 g KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			200 ml Méthanol
→ Porter à 1L avec de l'eau distillée	→ Porter à 1L avec de l'eau distillée	→ Porter à 1L avec de l'eau distillée	→ Porter à 1L avec de l'eau distillée

### Gel de concentration et migration :

Running 12 %	20 ml	Stacking	6 ml
H <sub>2</sub> O	8,4 ml	H <sub>2</sub> O	3,6 ml
Acrylamide 38,5 %	6,2 ml	Acrylamide 38,5 %	0,78 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml	1,5 M Tris pH 6,8	1,5 ml
SDS 10 %	0,2 ml	SDS 10 %	0,06 ml
APS 10 %	0,2 ml	APS 10 %	0,06 ml
TEMED	0,016 ml	TEMED	0,006 ml

## 5 Techniques relatives aux bactéries

### A. Transformation bactérienne par choc thermique

#### 1. Principe

La transformation bactérienne est un transfert génétique au cours duquel de l'ADN exogène est introduit dans une bactérie réceptrice.

#### 2. Méthode

Pour transformer des bactéries, ces dernières doivent être « compétentes » afin de permettre le passage trans-membranaire de matériel génétique. Dans le cas de cellules chimio-compétentes, les membranes acquièrent une perméabilité membranaire relative grâce au chlorure de calcium. Pour ce faire, les bactéries DH10B sont préalablement lancées en culture liquide. Une fois arrivées à une D.O.<sub>660nm</sub> entre 0,4 et 0,6 (phase exponentielle de croissance), elles sont centrifugées. Le culot résultant est resuspendu dans une solution hypotonique de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 60mM. Cette étape est réalisée deux fois. Ensuite, les bactéries sont placées pendant 30 minutes sur glace puis centrifugées et le culot est resuspendu dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 60 mM contenant 15% de glycérol. Les bactéries sont conservées à -80°C, aliquotées par 100 µl.



- ✚ Mélanger 5 µl de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes avec 5 à 10 µl d'ADN plasmidique.
- ✚ Incuber 30 minutes sur glace.
- ✚ Afin de créer un choc thermique permettant l'entrée de l'ADN dans les bactéries, placer les cellules à 42°C pendant 2 minutes.
- ✚ Ajouter 1 ml de LB.
- ✚ Incuber les cellules à 37°C pendant 45 minutes.
- ✚ Concentrer et étaler les cellules sur du milieu sélectif approprié.
- ✚ Placer les boîtes à 37°C pendant une nuit.

## B. Electroporation

### 1. Principe

L'électroporation permet d'introduire des molécules polaires (dans ce cas-ci, de l'ADN) dans des bactéries, à travers l'enveloppe bactérienne. Pour ce faire, les cellules électrocompétentes sont soumises à un choc électrique, perturbant momentanément l'organisation de la bicouche lipidique, permettant ainsi à l'ADN exogène de se retrouver au sein de la cellule.

### 2. Méthode

Pour électroporer des bactéries, celles-ci doivent être « électrocompétentes ». Pour ce faire, les bactéries sont préalablement lancées en culture liquide. Une fois arrivées à une D.O.<sub>660nm</sub> de 0,5 (phase exponentielle de croissance), elles sont centrifugées 10 minutes à 8000 rpm. Le culot résultant est lavé avec du glycérol 1%. Cette étape est reproduite 4 fois. Enfin, les bactéries sont aliquotées par 100 µl et placées à -80°C.

- ✚ Dégeler un aliquot de cellules électrocompétentes sur glace pendant 15 minutes.
- ✚ Déposer 50 µl de cellules compétentes et 5 µl d'ADN à électroporer dans la cuvette d'électroporation.
- ✚ Régler l'électroporateur (Gene Pulser) sur 25 µF, 2,5 kV et 200 Ω.
- ✚ Placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- ✚ Après l'électroporation, ajouter 1 ml de milieu PYE liquide aux bactéries.
- ✚ Incuber le tout 1 heure à 30°C (pour *C. crescentus*).
- ✚ Centrifuger 2 minutes à 8000 rpm.
- ✚ Enlever une partie du surnageant.
- ✚ Resuspendre le culot dans 150 µl de milieu liquide restant.
- ✚ Etaler sur boîtes solides.



## C. Tests de caractérisation des mutants

### 1. Courbe de croissance

- J-2 : Des précultures de différentes souches de *C. crescentus* sont lancées en PYE.
- J-1 : Les bactéries sont lavées et resuspendues dans le milieu adéquat.
- J-0 : Les cultures bactériennes sont diluées à une D.O.<sub>660nm</sub> de 0,12 puis sont placées dans une plaque 96 puits avec les conditions d'études appropriées.
- Une mesure automatique de la D.O.<sub>600nm</sub> est effectuée toutes les 15 minutes (Bioscreen C MBR). Les cultures sont à 30°C, sous agitation.

## 6 Techniques relatives aux acides nucléiques

### A. Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR est une technique d'amplification *in vitro* d'ADN. Un segment d'ADN, bordé par deux amorces connues et désignées au préalable, peut être amplifié de manière exponentielle au fil des cycles de la PCR. Ce processus comprend trois étapes principales : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. La première étape a pour but de séparer les deux brins d'ADN. Ensuite, les amorces, ou primers, viennent s'hybrider de part et d'autre de la séquence d'intérêt. Tout au long de l'étape d'élongation, la séquence située entre ces deux amorces va être amplifiée via une ADN polymérase thermorésistante.

La répétition de ces trois étapes (généralement une trentaine de fois), augmente exponentiellement le nombre de copies du fragment d'ADN d'intérêt. La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de *melting*  $T_m$  des amorces. Celle-ci se calcule comme suit :  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

#### Taq polymérase (Promega):

Les composants nécessaires à la réalisation d'une PCR "GoTaq" sont repris ci-dessous:

Produits	Quantité
Buffer de la Taq 5X	10 µl
dNTPs (5 µM)	2 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
ADN génomique	1 µl / 1 colonie
DMSO	2,5 µl
Taq DNA polymérase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	33,5 µl / 35 µl (en fonction de l'ajout ou non de DMSO)



Programme PCR :

Etapes	Température	durée
<b>Dénaturation</b>	98°C	10 minutes
<b>Amplification (30 cycles)</b>	98°C	30 secondes
	X°C	45 secondes
	72°C	Y minute(s)
<b>Elongation finale</b>	72°C	10 minutes

X= la température de *melting* des amorces.

Y= Temps à calculer selon la taille du segment à amplifier. Pour ce qui est de la Taq, cette dernière amplifie 1000 paires de base par minute.

Takara :

La Takara est une polymérase connue pour être extrêmement fidèle. Par conséquent, celle-ci permet d'amplifier des séquences d'ADN en limitant les mutations.

Les composants nécessaires à la réalisation de cette PCR sont repris ci-dessous:

Produits	Quantité
<b>Buffer de la Takara 2X</b>	25 µl
<b>dNTPs Takara (5 µM)</b>	4 µl
<b>Primer forward (10 µM)</b>	1 µl
<b>Primer reverse (10 µM)</b>	1 µl
<b>ADN génomique</b>	1 µl / 1 colonie
<b>Taq DNA polymérase</b>	0,5 µl
<b>H<sub>2</sub>O*</b>	18,5 µl

\* L'eau ainsi que l'ADN génomique sont mis en premier dans le tube PCR. Ce dernier sera chauffé 10 minutes à 100°C, afin d'obtenir un lysat clair. Les autres composants sont ensuite ajoutés.

Programme PCR :

Etapes	Température	durée
	98°C	30 secondes
<b>Amplification (30 cycles)</b>	68°C	Y minute(s)

Etapes	Température	durée
<b>Amplification (30 cycles)</b>	98°C	30 secondes
	60°C	45 secondes
	72°C	Y minute(s)

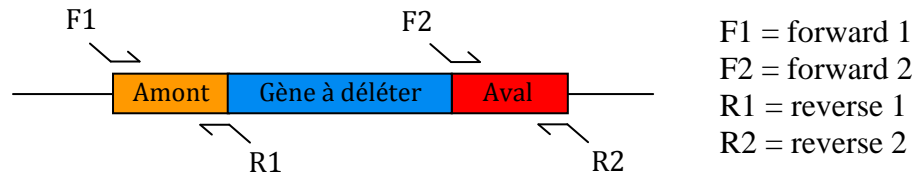




X= la température de *melting* des amorces.

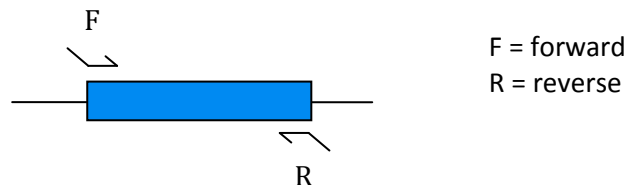
Y= Temps à calculer selon la taille du segment à amplifier. Pour ce qui est de la *Takara*, cette dernière amplifie 1000 paires de base par minute.

Liste des primers utilisés pour la création de délétants:



Gènes à déléter	régions	Sens de l'amorce	Séquences
<i>PcoAB<sub>Cc</sub></i>	Amont	Forward 1	GTCGACGTAGGTATCCGGCGGACGAA
		Reverse 1	GAATTCACCCCCGCTACGATCGCCCT
	Aval	Forward 2	GAATTCGCGGCCAGATCCGTCCGGCG
		Reverse 2	GGATCCGAAATAGTGGTCGCTGTTCT
<i>PcoA<sub>Cc</sub></i>	Amont	Forward 1	GTCGACGTAGGTATCCGGCGGACGAA
		Reverse 1	GAATTCACCCCCGCTACGATCGCCCT
	Aval	Forward 2	GAATTCTCATCGACCCGAGCATGAG
		Reverse 2	AAGCTTGGCCTTCAGGCCCTCCAGCT
<i>PcoB<sub>Cc</sub></i>	Amont	Forward 1	CGGAATTCGCCTCTATCCGCCAAGGAC
		Reverse 1	GCTCTAGAGCCCTGTGATGGGCGTGCGG
	Aval	Forward 2	GCTCTAGAATGTCGGCGTGGTGCGCGAG
		Reverse 2	CCCAAGCTTAGCTGCGCGAAGGTCGTCTC

Liste des primers utilisés pour la complémentation des délétants :



Gènes à amplifier	Sens de l'amorce	Séquences
<i>PcoAB<sub>Cc</sub></i>	Forward	AGCCCTGCCCATGGAGGGCGATCGTAGCGGGGGTG
	Reverse	AGCCCTGCTCTAGACTACCGCCAGGCGCTGACGC

## B. Minipréparation

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides présents chez les bactéries. La préparation d'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin, sa resuspension.



La minipréparation est réalisée comme suit :

- + La veille : Lancer, en préculture, une colonie isolée dans 5 ml de milieu liquide avec l'antibiotique approprié.
- + Centrifuger 1,5 ml de préculture à 125000 rpm pendant 5 minutes.
- + Eliminer le surnageant.
- + Ajouter 300 µl de P1 et resuspendre le culot de bactéries.
- + Ajouter 300 µl de P2.
- + Laisser incuber 5 minutes à température ambiante.
- + Ajouter 300 µl de P3.
- + Laisser 10 minutes sur glace.
- + Centrifuger le tout à 12500 rpm pendant 15 minutes.
- + Récupérer le surnageant et ajouter 700 µl d'isopropanol.
- + Centrifuger le tout à 12500 rpm pendant 15 minutes.
- + Enlever le surnageant et ajouter 300 µl d'éthanol 70%.
- + Centrifuger le tout à 12500 rpm pendant 5 minutes.
- + Enlever le surnageant et mettre sécher à 55°C.
- + Resuspendre dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O.

Les minipréparations peuvent aussi être réalisées via le kit Qiagen, de la manière suivante :

- + La veille : Lancer, en préculture, une colonie isolée dans 5 ml de milieu liquide avec l'antibiotique approprié.
- + Centrifuger 1,5 ml de préculture à 125000 rpm pendant 5 minutes.
- + Eliminer le surnageant.
- + Ajouter 250 µl de P1 et resuspendre le culot de bactéries.
- + Ajouter 250 µl de N2.
- + Ajouter 300 µl de N3.
- + Centrifuger le tout à 13000 rpm pendant 10 minutes.
- + Récupérer le surnageant et le déposer sur le filtre fourni dans le kit.
- + Centrifuger le tout à 13000 rpm pendant 1 minute.
- + Enlever le surnageant passé au travers du filtre et ajouter 750 µl de buffer PE.
- + Centrifuger le tout à 13000 rpm pendant 1 minute.
- + Enlever le surnageant passé au travers du filtre et centrifuger 1 minute supplémentaire.
- + Resuspendre en déposant 20 ou 35 µl d'H<sub>2</sub>O sur le filtre et centrifuger 1 minute à 13000 rpm.

### C. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique permettant de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille, grâce à l'application d'un champ électrique. La taille des fragments peut être estimée en faisant co-migrer un marqueur de taille connue : l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN se fait grâce à la présence de bromure d'éthidium, un composé fluorescent rendant la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille et à sa quantité.



### Etapes de fabrication du gel :

- ✚ Dissoudre par chauffage 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X.
- ✚ Couler le gel dans le support adéquat muni de peignes.
- ✚ Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.
- ✚ Laisser polymériser et charger les échantillons et le marqueur moléculaire.

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50X
Solution de 2mg/ml H <sub>2</sub> O	Glycérol 50 %	Tris-HCl pH 8,0 40 mM
	EDTA 100 mM	EDTA 50 mM
	SDS 1 %	Acide acétique glacial 57,1 ml/litre
	Bleu de bromophénol ou méthyl orange 0,25 %	

### D. Purification sur gel

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN dans un gel d'agarose, isolé au cours de l'électrophorèse. Pour ce faire, le kit Qiagen Gel Extraction® a été utilisé. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un filtre de silice auquel l'ADN adhère spécifiquement. Les sels et les impuretés seront ainsi éliminés. L'ADN est ensuite élué au contact de l'H<sub>2</sub>O désionisée.

- ✚ Couper, à l'aide d'un scalpel, le gel d'agarose contenant la bande d'ADN à purifier et le placer dans un eppendorf.
- ✚ Ajouter du buffer QG (3 fois le poids du gel : pour 100 µg de gel, mettre 300 µl de buffer QG) dans l'eppendorf.
- ✚ Placer l'eppendorf à 55°C jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissout.
- ✚ Placer le mélange sur une colonne QIAquick spin préalablement mise sur un nouvel eppendorf.
- ✚ Centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
- ✚ Enlever le surnageant présent dans l'eppendorf et ajouter 500 µl de buffer QG dans la colonne.
- ✚ Centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
- ✚ Enlever le surnageant présent dans l'eppendorf.
- ✚ Pour laver la colonne des sels et des impuretés, mettre 750 µl de buffer PE dans la colonne.
- ✚ Centrifuger 1 minute à 13000 rpm.
- ✚ Enlever le surnageant et centrifuger 1 minute à 13000 rpm pour s'assurer qu'il n'y a plus de buffer PE dans la colonne.
- ✚ Placer la colonne sur un nouvel eppendorf.
- ✚ Pour éluer l'ADN présent dans la colonne, ajouter 50 µl d'H<sub>2</sub>O désionisée.
- ✚ Attendre 1 minute à température ambiante.
- ✚ Centrifuger 1 minute à 13000 rpm.



## E. Purification sur colonne

Pour les purifications d'ADN sur colonne, le kit MSB® Spin PCR Rapace (500) d'Invitex a été utilisé. Le protocole permet de purifier et concentrer des fragments d'ADN simple ou double brin(s) allant de 80pb à 30kb.

- ✚ Dans un eppendorf, mélanger 250 µl de binding buffer et l'échantillon d'ADN à purifier.
- ✚ Déposer le mix sur une colonne Spin PCR Rapace et placer la colonne au-dessus d'un eppendorf.
- ✚ Centrifuger 2 minutes à 8000 rpm.
- ✚ Placer la colonne sur un nouvel eppendorf.
- ✚ Ajouter de l'eau (environ 20 µl) sur le filtre en silice afin d'éluer l'ADN.
- ✚ Attendre 1 minute à température ambiante.
- ✚ Centrifuger 2 minutes à 8000 rpm pour récolter l'ADN.

## F. Restriction de plasmide

Les enzymes de restriction sont des endonucléases permettant de cliver l'ADN double brin de manière spécifique : elles reconnaissent des sites de restriction, constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 6 paires de bases. La coupure peut être décalée d'un brin par rapport à l'autre, formant ainsi des « bouts protrudants ». Dans le cas où cette coupure n'est pas décalée, la restriction génère des « bouts francs ». Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical.

La composition du produit de restriction est la suivante :

- ✚ 2 µl de Buffer 10X en fonction de l'enzyme de restriction utilisée (A, B, L, M ou H).
- ✚ 1 µl d'enzyme de restriction.
- ✚ X µl de produit à restreindre.
- ✚ Porter à un volume final de 20 µl.
- ✚ Placer 1 heure à 37°C.

## 7 Technique relative aux protéines

### i. Préparation d'extraits protéiques en conditions dénaturantes

Les extraits protéiques préparés en conditions dénaturantes sont obtenus par centrifugation de cellules de *C. crescentus* pendant 10 min à 6000 rpm, resuspension dans 1/10<sup>ième</sup> de volume de tampon de chargement protéique (glycérol 10 %, β-mercaptoéthanol 1 %, SDS 10 %, Tris 1,5 M pH 6,8, bleu de bromophénol 0.05 %) et incubation durant 5 minutes à 100°C.





## ii. Immunodétection de protéines par Western Blot

Les protéines présentes dans les extraits cellulaires préparés en condition dénaturante sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12% (SDS-PAGE) et transférées sur membrane de nitrocellulose. Les immunodétections des protéines pcoA, pcoB et MreB sont réalisées respectivement à l'aide d'anticorps anti-Flag M2 (Invitrogen) 1:5000 et anti-MreB 1:1000. Les anticorps anti-Flag M2 et anti-MreB sont respectivement détectés à l'aide d'anticorps anti-anticorps de souris et anti-anticorps de lapin couplés à une peroxydase et dilués au 1:5000. L'activité peroxydase des anticorps secondaires est révélée par incubation de la membrane dans une solution de révélation ECL.

- ✚ Mettre les cellules en préculture, la veille.
- ✚ Normaliser les échantillons par la D.O.
- ✚ Lyser les cellules.
- ✚ Faire bouillir les échantillons protéiques.
- ✚ Charger l'étalon et les extraits protéiques dans les puits du gel et faire migrer ceux-ci à 40 mA.
- ✚ Transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose à fort ampérage.
- ✚ Saturer la membrane de nitrocellulose avec un mélange de 30 ml PBST 1X et de lait (5%).
- ✚ Rincer la membrane une fois avec du PBST 1x.
- ✚ Placer la membrane dans un mélange de 5 ml de PBST 1x, d'1 µL d'anticorps primaire et de lait (2%).
- ✚ Rincer la membrane trois fois avec du PBST 1x, pendant 5 minutes.
- ✚ Placer la membrane dans un mélange de 5 ml de PBST 1x, d'1 µL d'anticorps secondaire et de lait (2%) .
- ✚ Pour laver la colonne des sels et des impuretés, mettre 750 µl de buffer PE dans la colonne.
- ✚ Rincer la membrane trois fois avec du PBST 1x, pendant 5 minutes.
- ✚ Incuber la membrane dans la solution de révélation pendant 1 minute.
- ✚ Révéler la membrane.



### iii. Synchronisation

La synchronisation permet d'isoler une forme cellulaire bactérienne spécifique grâce à un gradient de densité. En effet, les différentes formes cellulaires de *C. crescentus* ont une densité différente (1,07 g/ml pour les cellules flagellées contre 1,01 g/ml contre les autres). Cette technique permet donc d'isoler les cellules flagellées du restant de la population bactérienne.

- ✚ Diluer les cellules, mises en culture la veille, dans un volume final de 300 ml de milieu de culture adéquat, afin d'obtenir une D.O.<sub>660</sub> de 0,5.
- ✚ Centrifuger les cellules à 4°C, dans des biberons, à 5000 RPM pendant 10 minutes
- ✚ Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml du Phosphate Buffer froid.
- ✚ Amener le volume à 50ml avec le  $\text{PO}_4^{3-}$  et ajouter 25,5 ml de Ludox.
- ✚ Homogénéiser le solution, et la transférer dans un tube corex de 25 ml froid
- ✚ Centrifuger à 9000 RPM pendant 40 minutes (4°C)
- ✚ Aspirer délicatement et éliminer la bande du dessus et le ludox. Récoltez la bande du dessous à l'aide d'une pipette. Transférer la bande obtenue dans une tube corex.
- ✚ Laver les cellules à l'aide de  $\text{PO}_4^{3-}$  et centrifuger 10 minutes à 8000 RPM.
- ✚ Resuspendre le culot avec le phosphate buffer et centrifuger à nouveau 5 minutes
- ✚ Eliminer le surnageant, et resuspendre le culot dans du milieu de culture de manière à obtenir une D.O.<sub>660</sub> de 0,3.



# **Bibliographie**



- [1] T. Brock and H. Freeze, "Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile," *Journal of Bacteriology*, vol. 98, no. 1, 1969.
- [2] T. D. Brock, K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss, "Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature.," *Archiv für Mikrobiologie*, vol. 84, no. 1, pp. 54–68, Jan. 1972.
- [3] J. Silander and J. Antonovics, "Ecological amplitude of *Spartina patens* . I. Morphometric and physiological traits," *Evolution*, vol. 33, no. 1979, pp. 79–87, 1979.
- [4] K. PANTOPOULOS, "Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update," *Annals of the New York Academy of ...*, vol. 5, 2006.
- [5] D. Baize, "Les Éléments traces métalliques dans les sols: approches fonctionnelles et spatiales," *Rapports de l'institut national d'agronomie de Paris*, vol. 9, no. 2, Jun. 2002.
- [6] D. Baize, "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols," *Rapports de l'institut national d'agronomie de Paris*, pp. 3190–9, Jul. 1997.
- [7] E. M. Nagy, S. Sitran, M. Montopoli, M. Favaro, L. Marchiò, L. Caparrotta, and D. Fregona, "Zinc(II) complexes with dithiocarbamate derivatives: Structural characterisation and biological assays on cancerous cell lines.," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 117, pp. 131–9, Dec. 2012.
- [8] M. Johnston, "Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein," *Nature*, vol. 328, pp. 353–355, 1987.
- [9] M. Bouzayen, G. Felix, A. Latch, J. Pech, and T. Borer, "Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene," pp. 244–247, 1991.
- [10] D. Osman and J. S. Cavet, "Copper homeostasis in bacteria.," *Advances in applied microbiology*, vol. 65, no. 08, pp. 217–47, Jan. 2008.
- [11] U. Runoff and S. Activities, "Copper Sources in Urban Runoff and Shoreline Activities," no. November, 2004.
- [12] F. Harrison and D. Bishop, "Review of the impact of copper released into freshwater environments," *Washington D.C. governmental reports*, 1983.
- [13] O. Menkissoglu and S. Lindow, "Relationship of free ionic copper and toxicity of bacteria in solutions of organic compounds.," *Phytopathology*, no. 81, pp. 1258–1263, 1991.
- [14] M. I. Samanovic, C. Ding, D. J. Thiele, and K. H. Darwin, "Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal.," *Cell host & microbe*, vol. 11, no. 2, pp. 106–15, Feb. 2012.





- [15] A. Mayer, "Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review," *Phytochemistry*, vol. 67, no. 21, pp. 2318–31, Nov. 2006.
- [16] M. L. Turski and D. J. Thiele, "New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 2, pp. 717–21, Jan. 2009.
- [17] G. Borkow and J. Gabbay, "Copper as a biocidal tool.," *Current medicinal chemistry*, vol. 12, no. 18, pp. 2163–75, Jan. 2005.
- [18] M. Yuan, Z. Chu, X. Li, C. Xu, and S. Wang, "The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution," *The Plant Cell Online*, vol. 22, no. 9, pp. 3164–76, Sep. 2010.
- [19] N. Kumar, B. Crum, R. C. Petersen, S. a Vernino, and J. E. Ahlskog, "Copper deficiency myelopathy.," *Archives of neurology*, vol. 61, no. 5, pp. 762–6, May 2004.
- [20] P. Bull, G. Thomas, and J. Rommens, "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene," *Nature genetics*, vol. 5, pp. 327–337, 1993.
- [21] R. Tanzi, K. Petrukhin, and I. Chernov, "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene," *Nature genetics*, vol. 5, no. 344–350, 1993.
- [22] E. C. Teixeira, J. C. Franco de Oliveira, M. T. Marques Novo, and M. C. Bertolini, "The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity.," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 154, no. Pt 2, pp. 402–12, Mar. 2008.
- [23] D. a Cooksey, H. R. Azad, J. S. Cha, and C. K. Lim, "Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, no. 2, pp. 431–5, Feb. 1990.
- [24] G. Grass, "Genes Involved in Copper Homeostasis in *Escherichia coli*," *Journal of bacteriology*, vol. 183, no. 6, pp. 2145–2147, 2001.
- [25] D. Thieme and G. Grass, "The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis.," *Microbiological research*, vol. 165, no. 2, pp. 108–15, Feb. 2010.
- [26] C. Rensing and G. Grass, "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 2–3, pp. 197–213, Jun. 2003.
- [27] S. M. Lee, G. Grass, C. Rensing, S. R. Barrett, C. J. D. Yates, J. V Stoyanov, and N. L. Brown, "The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 295, no. 3, pp. 616–20, Jul. 2002.



- [28] J. S. Cha and D. a Cooksey, “Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 20, pp. 8915–9, Oct. 1991.
- [29] a E. Voloudakis, C. L. Bender, and D. a Cooksey, “Similarity between Copper Resistance Genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*.,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 59, no. 5, pp. 1627–34, May 1993.
- [30] M. Solioz and J. V Stoyanov, “Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*.,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 2–3, pp. 183–195, Jun. 2003.
- [31] L. Banci, I. Bertini, R. Del Conte, J. Markey, and F. J. Ruiz-Dueñas, “Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ.,” *Biochemistry*, vol. 40, no. 51, pp. 15660–8, Dec. 2001.
- [32] J. Errington, “Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*.,” *Nature Reviews Microbiology*, pp. 1–2, 2003.
- [33] P. Zuber, “Management of oxidative stress in *Bacillus*.,” *Annual review of microbiology*, vol. 63, pp. 575–97, Jan. 2009.
- [34] J. M. Skerker and M. T. Laub, “Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*.,” *Nature reviews. Microbiology*, vol. 2, no. 4, pp. 325–37, Apr. 2004.
- [35] J. S. Poindexter, “The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria.,” *Microbiological reviews*, vol. 45, no. 1, pp. 123–79, Mar. 1981.
- [36] P. D. Curtis and Y. V Brun, “Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*.,” *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 74, no. 1, pp. 13–41, Mar. 2010.
- [37] C. L. Kirkpatrick and P. H. Viollier, “Decoding *Caulobacter* development.,” *FEMS microbiology reviews*, vol. 36, no. 1, pp. 193–205, Jan. 2012.
- [38] M. T. Laub, S. L. Chen, L. Shapiro, and H. H. McAdams, “Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 7, pp. 4632–7, Apr. 2002.
- [39] J. C. England, B. S. Perchuk, M. T. Laub, and J. W. Gober, “Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability.,” *Journal of bacteriology*, vol. 192, no. 3, pp. 819–33, Feb. 2010.
- [40] L. Britos, E. Abeliuk, T. Taverner, and M. Lipton, “Regulatory response to carbon starvation in *Caulobacter crescentus*.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 4, p. e18179, Jan. 2011.



- [41] N. Agabian, T. A. Chiaverotti, G. Parker, J. Gallant, and N. Agabian, "Conditions that trigger guanosine tetraphosphate accumulation in *Caulobacter* Conditions that Trigger Guanosine Tetraphosphate Accumulation in *Caulobacter crescentus*," *Journal of bacteriology*, vol. 145, pp. 1463–1465, 1981.
- [42] P. Hu, E. Brodie, Y. Suzuki, and H. McAdams, "Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*," *Journal of bacteriology*, vol. 187, no. 24, pp. 8437–8449, 2005.
- [43] M. F. Susin, R. L. Baldini, F. Gueiros-Filho, and S. L. Gomes, "GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*," *Journal of bacteriology*, vol. 188, no. 23, pp. 8044–53, Dec. 2006.
- [44] R. F. Lourenço and S. L. Gomes, "The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in *Caulobacter crescentus*," *Molecular microbiology*, vol. 72, no. 5, pp. 1159–70, Jun. 2009.
- [45] M. T. Laub, "Global Analysis of the Genetic Network Controlling a Bacterial Cell Cycle," *Science*, vol. 290, no. 5499, pp. 2144–2148, Dec. 2000.
- [46] A. Changela, K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V O'Halloran, and A. Mondragón, "Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 301, no. 5638, pp. 1383–7, Sep. 2003.
- [47] P. Entcheva-dimitrov and A. M. Spormann, "Dynamics and Control of Biofilms of the Oligotrophic Bacterium *Caulobacter crescentus*," *Journal of bacteriology*, vol. 186, no. 24, 2004.
- [48] E. a Campbell, N. Korzheva, a Mustaev, K. Murakami, S. Nair, a Goldfarb, and S. a Darst, "Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase.," *Cell*, vol. 104, no. 6, pp. 901–12, Mar. 2001.
- [49] G. Andersen, O. Menkissoglou, and S. Lindow, "Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California.," *Phytopathology*, 1991.
- [50] S. D. Gupta, B. T. Lee, J. Camakaris, and H. C. Wu, "Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*," *Journal of bacteriology*, vol. 177, no. 15, pp. 4207–15, Aug. 1995.
- [51] R. Shackelford, "Oxidative stress and cell cycle checkpoint function.," *Free radical biology & Medecine*, vol. 28, no. 9, pp. 1387–1404, 2000.
- [52] C. Winterbourn, "Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction," *Toxicology letters*, vol. 82, pp. 969–974, 1995.



- [53] C. Berrier, M. Besnard, and B. Ajouz, "Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure," *Journal of Membrane Biology*, vol. 187, pp. 175–187, 1996.
- [54] Z. Gitai, N. Dye, and L. Shapiro, "An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 23, pp. 8643–8, Jun. 2004.
- [55] N. a Dye, Z. Pincus, J. a Theriot, L. Shapiro, and Z. Gitai, "Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*.,," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 51, pp. 18608–13, Dec. 2005.
- [56] Z. Gitai, "Diversification and specialization of the bacterial cytoskeleton.," *Current opinion in cell biology*, vol. 19, no. 1, pp. 5–12, Feb. 2007.
- [57] Z. Gitai, N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, and L. Shapiro, "MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome.," *Cell*, vol. 120, no. 3, pp. 329–41, Feb. 2005.





# **Annexe**



## Annexe A

Protéine chez <i>E. coli</i>	Homologue fonctionnel chez <i>C. crescentus</i> ?	Locus	e Value	Annotation
CopA	Oui	cc1407	$6,5e^{-89}$	Cation-transporting ATPase
CueO	Oui	cc0964	$1e^{-29}$	Copper-binding protein
CueR	?	cc3082	$1,5e^{-14}$	Transcriptional regulator, MerR family
CusA	Oui	cc2390	$5e^{-158}$	Heavy metal efflux pump
CusB	Oui	cc2389	$1,2e^{-7}$	Heavy metal efflux transporter, RND family
CusC	?	cc2388	0,018	Efflux transporter, outer membrane factor (OMF) family
CusF	Non	/	/	/
CusR	Oui	cc2757	$1,9 e^{-48}$	DNA-binding response regulator
CusS	Oui	cc2755	$7,5e^{-22}$	Sensor histidine kinase
PcoA	Oui	cc0964	$1e^{-29}$	Copper-binding protein
PcoB	Oui	cc0965	$8e^{-37}$	Copper-binding protein
PcoC	Non	/	/	/
PcoD	Non	/	/	/
PcoE	Non	/	/	/
PcoR	Non	/	/	/
PcoS	Non	/	/	/

**Tableau 1 : Séquences codantes présentes chez *C. crescentus* homologues aux différentes 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 présentés.

