



HAL
open science

Recherche de nouveaux métabolites secondaires chez *Streptomyces ambofaciens* par une approche novatrice de génomique comparée

Anthony Houin

► **To cite this version:**

Anthony Houin. Recherche de nouveaux métabolites secondaires chez *Streptomyces ambofaciens* par une approche novatrice de génomique comparée. *Biotechnologies*. 2016. hal-01824836

HAL Id: hal-01824836

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01824836>

Submitted on 27 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master BioMANE 2^{ème} année
*Biotechnologies, Microbiologie, Aliment,
Nutrition, Environnement*

Spécialité BM : Biotechnologies Microbiennes

Année Universitaire 2015/2016

*Recherche de nouveaux métabolites secondaires chez
Streptomyces ambofaciens par une approche novatrice de
génomique comparée*

Mémoire présenté par
Anthony HOUIN

Stage effectué du 18 Janvier au 15 Juillet 2016

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations	4
Introduction.....	5
I) Le genre <i>Streptomyces</i>	6
a) Généralités	6
b) Quelques exemples de <i>Streptomyces</i> et des métabolites secondaires produits.....	8
c) Génome.....	8
II) Approches permettant la découverte de nouveaux métabolites secondaires	10
a) Approches reposant sur l'étude <i>in vivo</i>	10
b) Techniques reposant sur l'étude des séquences génomiques (genome mining).....	11
c) Recherche de nouveaux composés par « genome mining » dans les îlots génomiques	12
III) Projet et objectifs du stage	13
Matériel et méthodes	15
1) Souches et milieux de culture.....	15
2) Manipulation d'ADN.....	15
3) Construction du mutant OSC6 bis.....	20
4) Excision d'îlot génomique grâce au système CRISPR-Cas 9.....	21
5) Expression hétérologue d'un îlot génomique en utilisant le système TAR.....	21
Résultats.....	22
1) Construction du mutant OSC6 bis.....	22
2) Délétion d'îlots génomiques avec le système CRISPR-Cas9	27
3) Expression hétérologue d'îlots génomiques avec le système TAR.....	33
Discussion, perspectives	35
1) Obtention du mutant OSC6 bis	35
2) Délétion des îlots génomiques en utilisant la technologie CRISPR.....	36
3) Expression hétérologue d'îlots génomiques avec le système TAR.....	38
Bibliographie.....	39
Sitographie	43
Annexe 1 : Amorces	45
Annexe 2 : Cartes des différents plasmides utilisés	47
Annexe 3 : Copie de la convention de stage	49

Remerciements

Pour commencer je tiens à remercier le laboratoire DynAMic et plus particulièrement le professeur Pierre Leblond de m'avoir permis de réaliser mon stage de M2 dans ses locaux, ainsi que l'université de Lorraine pour son financement.

Je tiens à remercier mon maître de stage, le professeur Bertrand Aigle, de m'avoir accepté dans son équipe en tant que stagiaire M2, pour ses conseils, ainsi que pour son aide dans la rédaction de ce rapport de stage. Je tiens également à remercier Cláudia pour son aide dans la réalisation des différentes expériences effectuées au cours de ce stage ainsi que pour la rédaction de ce rapport. J'aimerais aussi remercier Laurence pour son aide sur certaines expériences notamment pour la PFGE.

Je voudrais également remercier l'ensemble de l'équipe StrAda qui était toujours disponible et qui répondait à toutes mes questions concernant la compréhension de mon sujet ou la réalisation de certaines expériences. Je remercie également Layla pour son aide dans la partie administrative.

Enfin je tiens à remercier le reste du laboratoire, notamment Philippe, Nazim, Paul et les autres stagiaires pour leur bonne humeur et leur soutien ce qui nous a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Liste des abréviations

5 FOA : 5-fluoroorotic acid

antiSMASH : antibiotics And Secondary Metabolite Analysis Shell

Apra : Apramycine

ARNsg : single guide RNA

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

BET : bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

bp : base pair (paire de bases)

Cm : Chloramphénicol

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

DO : Densité optique

DMSO : diméthylsulfoxyde

FAS : Fatty Acid synthase

Kan : Kanamycine

Kb : kilo base

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NRPS : Non Ribosomal Polypeptide Synthase

PAM : protospacer adjacent motif

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérase en chaîne)

PFGE : pulsed fields gel electrophoresis (gel d'électrophorèse en champs pulsés)

PKS : Polyketide synthase

Qsp : Quantité suffisante pour

Rev : reverse (amorce antisens)

rpm : Rotation par minute

Taq : *Thermophilus aquaticus*

TAR : Transformation Associated Recombination

TBE : Tris Borate EDTA

TIR : Terminal Inverted Repeat

Th : Thiostrepton

Tm : température de demi-dénaturation

UFC : Unité formant colonie

Introduction

*Présentation du laboratoire

J'ai effectué mon stage au sein du laboratoire DynAMic (Dynamique des génomes et Adaptation Microbienne) qui est une unité mixte de recherche (UMR) entre l'Université de Lorraine et l'INRA. La thématique de recherche de l'unité concerne les mécanismes d'évolution rapide chez les bactéries, dont le transfert horizontal de gènes qui est le mécanisme d'évolution prépondérant. Ce transfert consiste en un échange d'information génétique entre bactéries apparentées ou non d'un même écosystème. Cette unité est composée de deux équipes : ICE-Tea (Integrative and Conjugative Element in *Streptococci*) dont le thème de recherche est l'étude de la diversité et du transfert des ICE au sein des *Streptocoques*, et StrAda (*Streptomyces* Adaptation) l'équipe dans laquelle s'inscrit ce stage et dont le thème de recherche est l'étude de l'évolution des génomes de *Streptomyces* et l'adaptation de ces bactéries à leur environnement. Le laboratoire est composé de 3 professeurs, 7 maîtres de conférences, 1 chargée de recherche INRA, 1 post-doctorante, 4 doctorants, 7 techniciens, une secrétaire et est dirigé par le professeur Pierre Leblond.

*Avant-propos

La réémergence de maladies infectieuses liées à la multiplication de souches bactériennes résistantes voire multirésistantes aux antibiotiques actuellement sur le marché est un des problèmes majeurs de santé publique (Giske *et al.*, 2008). En effet tous les ans, plus de 37.000 morts en Europe et plus de 99.000 aux Etats-Unis sont attribués à des infections nosocomiales résistantes aux antibiotiques (source : European Centre for Disease Prevention and Control, site 1). Il devient donc nécessaire de trouver de nouvelles molécules efficaces contre ce type de pathogènes (Boucher *et al.*, 2009).

Il existe de nombreuses techniques permettant la détection de nouvelles molécules bioactives. Certaines reposent sur l'étude des bactéries *in vivo*, d'autre sur des approches *in silico*. Ces différentes techniques seront exposées plus en détail dans la suite de ce rapport. Enfin l'approche que je vais utiliser ici est une nouvelle approche *in silico* de détection de loci contenant potentiellement des gènes de biosynthèse qui se base sur l'étude des îlots génomiques.

Le genre bactérien le plus souvent cité comme producteur d'antibiotiques est le genre *Streptomyces*. En effet on estime qu'environ 70% des antibiotiques d'origine microbienne utilisés aujourd'hui en médecine humaine et vétérinaire sont produits ou dérivés des antibiotiques produits

par ce genre bactérien (Newman and Cragg, 2012). Ce genre bactérien est également connu pour sa production d'un grand nombre de métabolites secondaires qui n'ont pas de propriété antibiotique.

I) Le genre *Streptomyces*

a) Généralités

Les *Streptomyces* sont des bactéries Gram positives, filamenteuses appartenant au groupe des actinomycètes, groupe qui englobe la majorité des espèces bactériennes du sol. On estime qu'un gramme de sol contient 10^9 UFC (unités formant colonie) et que sur ces 10^9 UFC, 10^7 sont des actinomycètes (Baltz, 2007). Ce sont des bactéries ubiquistes du sol, aussi retrouvées en milieu marin (sédiments..., Selvakumar *et al.*, 2015), certains sont des symbiotes d'éponges par exemple, ou encore d'insectes comme la fourmi *Acromyrmex octospinosus*. Elle vit en symbiose avec un *Streptomyces* (*Streptomyces S4*) produisant des antifongiques ce qui permet de protéger les champignons cultivés par la fourmi des phytopathogènes (Seipke *et al.*, 2011).

Les *Streptomyces* ont un cycle de développement particulier. Ce cycle commence par une spore qui va germer en formant des hyphes végétatives très peu septées qui vont se structurer en un réseau : le mycélium végétatif dont le rôle est d'explorer le milieu à la recherche de nutriments. La bactérie va former des hyphes aériennes compartimentalisées lors d'une carence en éléments nutritifs, ces hyphes se différencieront ensuite en spores qui sont la forme de résistance et de dissémination de cette bactérie (Claessens *et al.*, 2006) (figure 1).

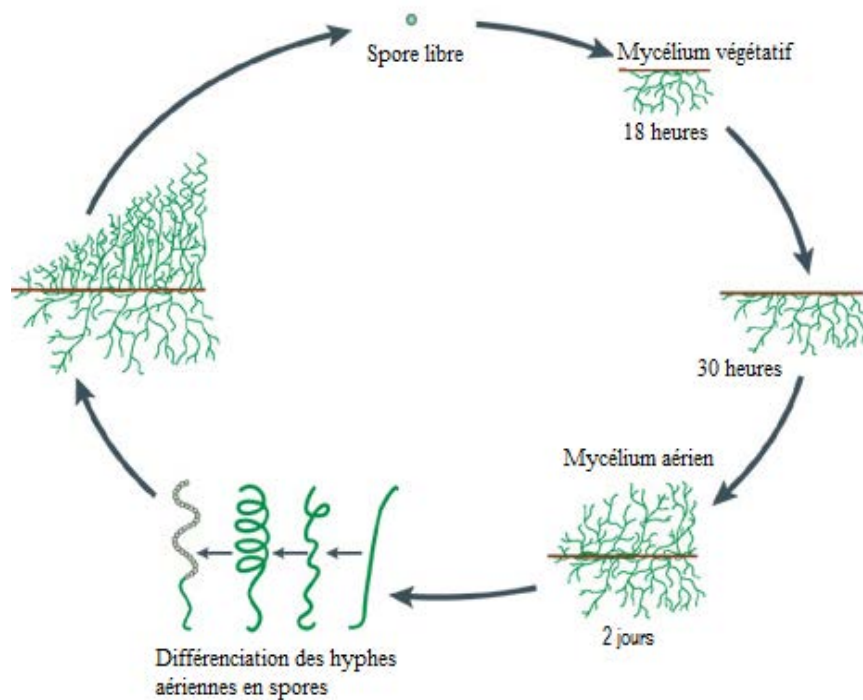


Figure 1 : Cycle de développement des *Streptomyces* (d'après Angert, 2005)

La production de nombreux métabolites secondaires y compris les antibiotiques est couplée avec la différenciation morphologique. En effet on observe une plus grande production de métabolites secondaires lors du passage de la croissance végétative à la croissance aérienne (Granozzi *et al.*, 1990). Lors de ce changement de type de croissance, une lyse partielle du mycélium végétatif a lieu afin de fournir les éléments nutritifs nécessaires à la création du mycélium aérien, cette libération de nutriments pourrait attirer des compétiteurs. Cette synchronisation du cycle de développement et de la production de métabolites secondaires pourrait être un moyen pour la bactérie de se débarrasser des envahisseurs afin de garder ces nutriments ou alors de tuer les bactéries environnantes pour s'en nourrir.

Les différents métabolites secondaires connus sont synthétisés par quatre voies principales de biosynthèse différentes : la voie peptidique, les PKS, les NRPS et la voie glucidique. La voie peptidique concerne une partie des métabolites secondaires protéiques : ils sont synthétisés par simple traduction des ARNm en peptides par les ribosomes. Les NRPS (non ribosomal polypeptide synthase) sont des enzymes capables de condenser des acides aminés de manière à former des peptides sans passer par la voie de synthèse ribosomique. Les PKS (polyketide synthase), sont des enzymes capables de synthétiser une famille particulière de métabolites secondaire : les polycétides. Les enzymes nécessaires à la synthèse de ces polycétides sont des homologues des FAS (fatty acid synthase) qui sont responsables de la synthèse des chaînes d'acides gras. Comme les FAS ces enzymes peuvent coupler des précurseurs pour former une chaîne. Cette chaîne subira ensuite des

modifications post-PKS avant de devenir active. En ce qui concerne la voie glucidique, elle repose sur l'utilisation d'enzymes capables de coupler différents sucres afin de former un précurseur glucidique, cette chaîne subira ensuite des modifications qui rendront le précurseur actif (Clardy *et al.*, 2009).

b) Quelques exemples de *Streptomyces* et des métabolites secondaires produits

Le premier antibiotique produit par un *Streptomyces* à avoir été identifié est la streptomycine (Schatz *et al.*, 1944), produite par *Streptomyces griseus* et utilisée à l'époque comme traitement contre la tuberculose. Sa découverte a permis à Selman A. Waksman de recevoir le prix Nobel en 1952 (site 2).

L'espèce qui est souvent utilisée comme modèle pour les *Streptomyces* est *Streptomyces coelicolor*, et plus précisément la souche A3(2). Ce microorganisme possède de nombreux clusters impliqués dans la synthèse d'antibiotiques (actinorhodine, antibiotiques dépendants au calcium...), de sidérophores (desferrioxamines, coelicheline...), de pigments (tétrahydroxynaphtalène), de lipides et d'autres molécules (Bentley *et al.*, 2002).

Streptomyces avermitilis est un *Streptomyces* qui produit des molécules antiparasitaires (ou antihelminthique) : les avermectines qui sont utilisées en médecine humaine et vétérinaire depuis les années 80. L'ivermectine, obtenue par hémisynthèse à partir d'avermectine, possède des propriétés antiparasitaires très intéressantes ce qui a permis aux deux scientifiques responsables de sa découverte (le professeur Satoshi Ōmura) et sa caractérisation (le docteur William C. Campbell) d'obtenir le prix Nobel de Médecine ou physiologie en 2015 (site 3).

Streptomyces ambofaciens a été découvert dans les années 50 à Péronne dans la Somme (Pinnert-Sindico, 1954) et est connu pour la production de congocidine (Cosar *et al.*, 1952) et de spiramycine (Pinnert-Sindico, 1954). Par la suite d'autres antibiotiques ont été isolés à partir de cette souche : kinamycine (Pang *et al.*, 2004), stambomycine (Laureti *et al.*, 2011), ainsi que l'antimycine qui est un antifongique (Schoenian *et al.*, 2012).

c) Génome

Le génome des *Streptomyces* est particulier : il est composé d'un chromosome linéaire très riche en bases azotées guanine et cytosine, d'une grande taille (entre 8 et 11 Mb). De plus le génome des *Streptomyces* possède des séquences répétées inversées à chacune de leurs extrémités dont la taille est variable en fonction des espèces : d'une centaine de paires de bases (Pandza *et al.*, 1998) à plus de 400 kb (Pandza *et al.*, 1997).

Le séquençage des différents génomes a révélé que la capacité des *Streptomyces* à synthétiser des métabolites secondaires avait été largement sous-estimée. En effet si on prend l'exemple de *S. coelicolor* A3(2), premier *Streptomyces* dont le génome a été entièrement séquencé en 2002, 5 de ses métabolites secondaires étaient identifiés avant 2002, puis le séquençage a montré que plus de 20 clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires étaient présents dans la souche (Bentley *et al.*, 2002). Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces clusters découverts par analyse de séquences sont cryptiques, c'est-à-dire qu'ils ne s'expriment pas, ou trop faiblement, en conditions classiques de laboratoire. Cet écart entre le nombre de métabolites produits connus et le nombre de métabolites codés par le génome n'est pas spécifique à cette souche, le séquençage d'autres *Streptomyces* a montré qu'il pouvait y avoir jusqu'à 30 clusters de gènes cryptiques dans un même génome (Aigle *et al.*, 2014). Par exemple le génome de *S. griseus* contient 34 clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires (Ohnishi *et al.*, 2008)

En ce qui concerne *S. ambofaciens*, son génome a été entièrement séquencé par le laboratoire (Thibessard *et al.*, 2015) et a permis notamment de relier certains composés comme la congocidine à leur cluster de gènes de biosynthèse respectif, ainsi que d'identifier des kinamycines, des stambomycines et des antimycines (figure 2).

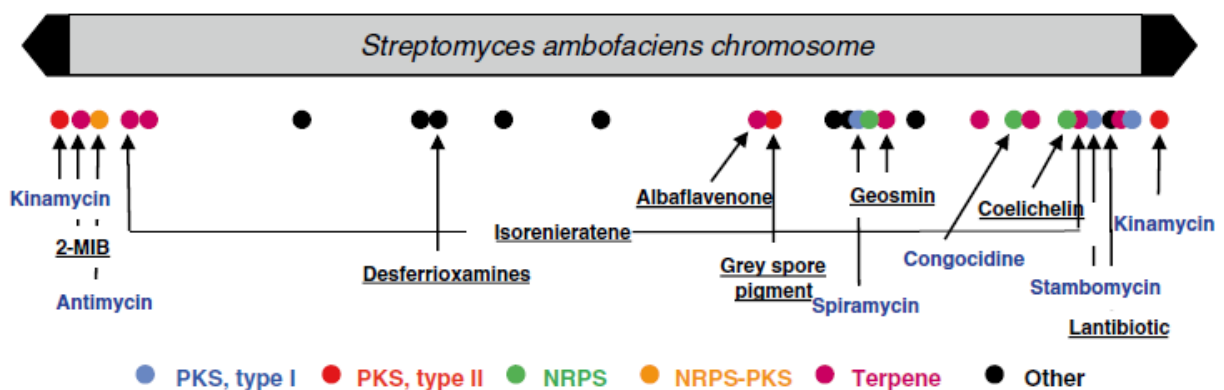


Figure 2 : Carte génétique du chromosome de *Streptomyces ambofaciens* et localisation des différents clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires (Aigle *et al.*, 2014)

Les clusters de gènes de biosynthèse des métabolites secondaires sont indiqués par des points, leur couleur correspond au type de gène contenu dans ces clusters. Les flèches noires aux extrémités indiquent les zones terminales inversées répétées (TIRs dont la taille est de 200 Kb).

II) Approches permettant la découverte de nouveaux métabolites secondaires

a) Approches reposant sur l'étude *in vivo*

Une des approches que l'on peut utiliser pour découvrir de nouveaux métabolites secondaires est de rechercher de nouveaux organismes producteurs en se basant sur des criblages des tests d'activités (de bioessais) contre des souches indicatrices (Schrey *et al.*, 2012).

Cependant ce type d'approche entraîne un travail énorme, il faut tester un grand nombre de bactéries productrices avant de trouver celle qui permet d'inhiber la croissance du microorganisme. Pour cela des technologies d'automatisation par microplaques ont vus le jour (Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2012) mais ce type de technique reste quand même assez long et fastidieux à mettre en place. Ce type d'approche présente un autre problème : la redondance des métabolites identifiés, en effet il arrive assez souvent d'isoler des molécules déjà identifiées, par exemple on estime que la streptothricine est retrouvée dans 10 % des *Streptomyces* testés (Baltz, 2007).

Un autre problème se pose souvent dans ces techniques qui reposent sur la culture des bactéries : certains composés ne sont synthétisés que dans certaines conditions (présence d'un composé particulier, carence en nutriment, présence d'une molécule signal...) (Rigali *et al.*, 2008). Une solution est d'utiliser l'approche OSMAC (One strand Many Compounds) (Bode *et al.*, 2002). Cette approche consiste tester différentes conditions de croissance (composition du milieu, température, oxygénation, pH ...) sur une même souche. Elle peut permettre d'activer des clusters cryptiques car une des conditions testées peut permettre l'activation de ce dernier. Par exemple un milieu peut contenir un nutriment utilisé comme régulateur comme la N-glucosamine qui permet d'activer un certain nombre de clusters de biosynthèse de métabolite secondaire (Swiatek *et al.*, 2012).

Mais le problème majeur de ce type d'étude est le fait qu'à l'heure actuelle on ne sait cultiver qu'environ 1% des bactéries donc ce type d'approche ne permet pas l'étude des 99% restants qui pourraient être une grande source de nouveaux métabolites secondaires (Lewis, 2013). Ce problème de cultivabilité a entraîné le développement de méthodes culturales dont le but est d'accéder, au moins en partie, à cette richesse. Récemment une de ces technologies a vu le jour ; l'iChip®. Cette technologie permet de cultiver la bactérie dans une puce placée son milieu naturel, puis la puce est récupérée pour analyser les différents métabolites produits par les bactéries qui s'y sont développées (Ling *et al.*, 2015) (figure 3).

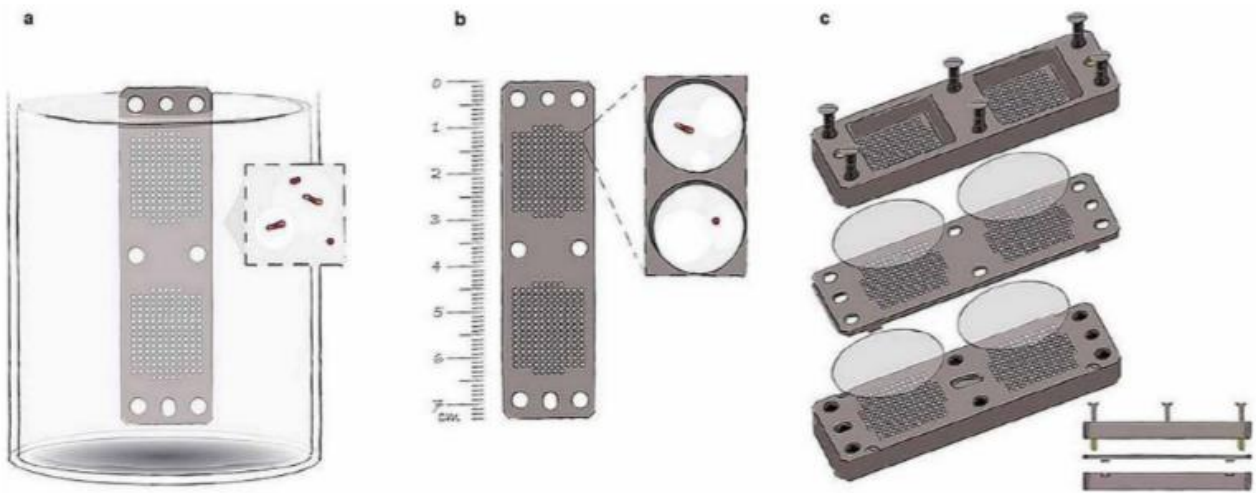


Figure 3 :Principe de fonctionnement de l'iChip (Ling et al., 2015)

La puce est plongée dans une solution contenant des bactéries prélevées du sol (a) à une concentration telle que chaque canal ne soit occupé que par une seule bactérie (b). Des membranes de cellophanes sont placées de part et d'autre de la puce pour permettre les échanges entre la bactérie et son milieu sans permettre à la bactérie de sortir du canal, puis la puce est fixée entre 2 supports (c). L'ensemble sera ensuite déposé dans le milieu où les bactéries ont été prélevées.

Cette technique a permis de découvrir un nouvel antibiotique : la teixobactine qui se révèle être efficace contre des bactéries multirésistantes comme la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (Ling et al., 2015).

b) Techniques reposant sur l'étude des séquences génomiques (genome mining)

Comme décrits précédemment, l'accès aux séquences génomiques de nombreuses bactéries mais également de champignons a mis en évidence la présence d'un grands nombre de clusters de gènes de biosynthèse. L'analyse des séquences génomiques consiste en une étude *in silico* de ces séquences en les comparant avec d'autres séquences ce qui permet de détecter des gènes et des clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires par exemple. On compare la séquence du génome de notre bactérie étudiée avec les différentes séquences présentes dans les bases de données (Genbank, NCBI, ...) en utilisant l'outil informatique comme le logiciel BLAST du NCBI par exemple (site 4). Cette approche permet de trouver des gènes homologues à des gènes de biosynthèse classique (NRPS, PKS,...) mais elle présente un défaut : un cluster qui reposerait sur une nouvelle voie de biosynthèse ne pourrait pas être mis en évidence en utilisant cet outil car les gènes qui le composent n'ont pas d'homologues dans les bases de données, ou alors les homologues codent des fonctions inconnues.

Jusqu'à présent la détection de nouveaux gènes ou clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires par analyse *in silico* reposait uniquement sur l'homologie de séquences.

c) Recherche de nouveaux composés par « genome mining » dans les ilots génomiques

Cette approche est celle qui est développée dans le projet dans lequel s'intègre mon stage. Elle part du fait que certains clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires sont portés par des ilots génomiques. Un ilot génomique est une région du génome la séquence diffère entre deux souches phylogénétiquement proches et qui peut être acquis par transfert horizontal de gènes (Juhas *et al.*, 2009). On parle d'ilots génomique car ce fragment d'ADN est intégré dans une zone où les séquences comparées sont identiques, leur présence se manifeste par une rupture de la synténie dans les 2 génomes comparés (la synténie étant la conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées). Ces ilots peuvent coder de nombreux éléments comme les facteurs de pathogénicité (Hacker *et al.*, 1990), des composants du métabolisme de certains composés aromatiques (Gaillard *et al.*, 2006), la synthèse de sidérophores ou la résistance au mercure (Larbig *et al.*, 2002). De plus des études bioinformatiques ont mis en avant le fait que certains clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires étaient portés par ces ilots. Par exemple, lorsque l'on compare les séquences de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* qui sont deux *Streptomyces* très proches phylogénétiquement, le cluster de gènes de biosynthèse de la congocidine chez *S. ambofaciens* est porté par un ilot génomique. Si on prend l'exemple de l'oligomycine produite par *S. avermitilis* ou celui de la streptomycine produite par *S. griseus*, on remarque que les clusters responsables de la synthèse de ces deux composés se retrouvent dans des ilots génomiques flanqués par des régions conservées dans les génomes de deux espèces. En effet le cluster de l'oligomycine se retrouve entre l'opéron F0-F1 ATPase et le gène *tagO* responsable de la synthèse de l'acide théicoïque (acide permettant la fixation du peptidoglycane sur la membrane des bactéries). Le cluster responsable de la biosynthèse de la streptomycine est placé entre l'ARNt synthétase de la phénylalanine et un gène responsable du catabolisme des acides gras (le gène *fadC*). Tous ces gènes et clusters flanquants sont essentiels et sont retrouvés dans le même ordre lorsque l'on compare les génomes de différentes espèces de *Streptomyces* (Nett *et al.*, 2009).

Enfin certaines voies de biosynthèse n'auraient jamais pu être découvertes par une approche basée sur l'homologie de séquence car les produits des gènes impliqués ne présentent pas de similarité avec des protéines de biosynthèse de métabolites secondaires connues. En effet si on prend l'exemple du thiostrepton, bien qu'il soit connu depuis le début des années 90 (Smith *et al.*, 1995), son cluster de gènes de biosynthèse n'a été découvert qu'à la fin des années 2000 ce qui s'explique par le fait qu'aucune des enzymes responsables de sa biosynthèse n'avait d'homologue à cette époque (Liao *et al.*, 2009).

Tous ces points indiquent que l'étude des îlots génomiques pourrait permettre de découvrir de nouveaux clusters de métabolites secondaires.

III) Projet et objectifs du stage

La souche *S. ambofaciens* utilisée comme référence dans le cadre de mon stage est la souche sauvage ATCC 23877, à partir de cette souche a été réalisé un mutant délété dans 3 clusters responsables de la production d'antibiotiques (spiramycine, congocidine et kinamycines) : la souche OSC4. A partir de ce mutant OSC4 a été réalisé un mutant délété dans 4 clusters responsables de la production d'antibiotiques (spiramycine, congocidine, stambomycine, kinamycine) : la souche OSC5. Cette souche OSC5 montre encore des activités antimicrobiennes malgré ces délétions (figure 4).

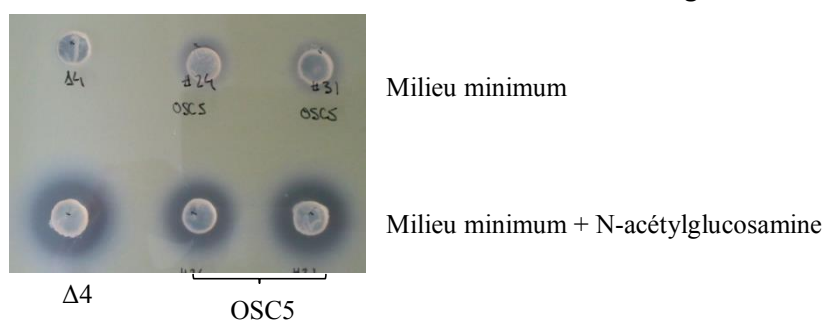


Figure 4 : Test d'activité entre la souche OSC5 et la bactérie indicatrice Micrococcus luteus
Les plugs de gauche sont des plug prélevés à partir d'une culture de la souche Δ4 qui possède les mêmes délétions que la souche OSC5 mais obtenues à partir de souches parentales différentes. Les deux plugs de droites proviennent d'une culture de deux clones OSC5. Les plugs de la première ligne proviennent de culture en milieu minimum et ceux de la deuxième ligne proviennent de culture en milieu minimum complété en N-acétylglucosamine. On remarque qu'en présence de ce composé la souche OSC5 produit un composé qui inhibe la croissance de *Micrococcus luteus* (halo transparent autour du plug).

Cette activité a également été observée chez tous les simples mutants réalisés dans l'ensemble des clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires identifiés suite à l'analyse de la séquence génomique de *S. ambofaciens*. Cette persistance d'activité implique la présence d'au moins un cluster de gènes de synthèse d'antibiotique qui n'a pas été identifié lors de cette analyse. Comme mentionné précédemment, les clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires peuvent correspondre à des îlots génomiques lorsque l'on compare deux souches phylogénétiquement proches. L'idée est donc de comparer la souche *S. ambofaciens* ATCC 23877 avec une autre souche de *S. ambofaciens*, la souche DSM40697 ce qui permet d'identifier l'ensemble des îlots génomiques présents dans ces souches. Cette comparaison a été réalisée en utilisant le logiciel Syntheruptor® (logiciel développé dans le cadre d'un projet ANR entre le laboratoire et des partenaires de l'université de Paris IX, Orsay) qui permet de mettre en évidence

les ruptures de synténie. Elle a mis en évidence la présence de 18 îlots génomiques qui se manifestent par autant de ruptures de la synténie entre les deux séquences (figure 5).

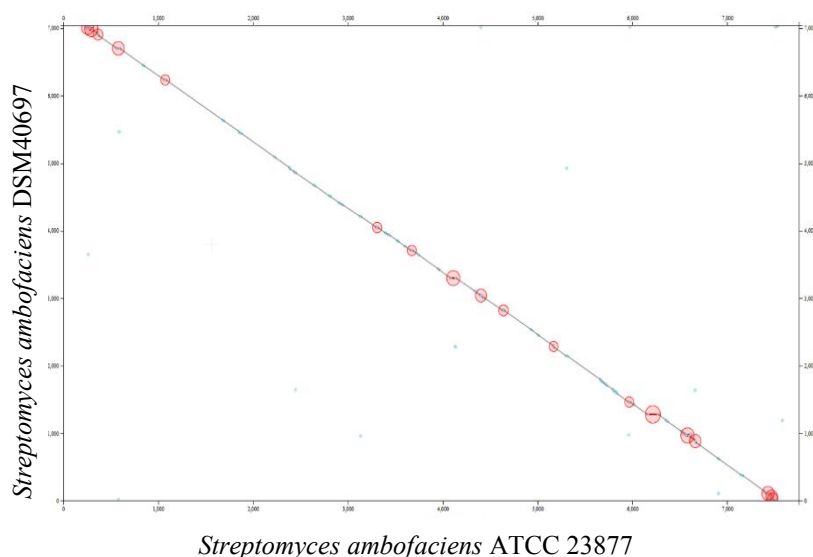


Figure 5 : Dotplot entre le génome de la souche ATCC23877 et le génome de la souche DSM40697
Un dotplot est un graphique dans lequel est représenté l'ordre d'apparition des gènes dans les 2 souches étudiées, le fait d'avoir une ligne droite signifie que l'ordre des gènes est le même dans les deux souches on parle alors de synténie. Chaque cercle rouge représente une rupture de la synténie entre les deux séquences, ces ruptures de synténie sont des îlots génomiques, il y en a 18 entre ces deux souches

Le but de ce stage est donc de valider l'hypothèse suivante : l'activité antibactérienne observée n'est pas corrélée avec des clusters de biosynthèse classiques, elle pourrait donc être portée par un nouveau type de cluster qui peut se retrouver dans un îlot génomique.

Cette hypothèse va être testée en utilisant deux approches différentes : la délétion et l'expression hétérologue de chacun de ces îlots. La délétion des îlots est obtenue grâce à la technologie CRISPR (Tong *et al.*, 2015), et l'expression hétérologue grâce au système TAR (Tang *et al.*, 2015).

Un autre objectif de ce stage est la réalisation d'un mutant délété dans le cluster de la biosynthèse de l'antimycine, à partir de la souche OSC5, dans le but d'obtenir un mutant délété dans tous les clusters de biosynthèse de métabolites secondaires connus qui ont une activité antibactérienne ou antifongique. Ce mutant permettra de faciliter les analyses futures car il permet de réduire le bruit de fond par rapport à la souche sauvage (moins de pics en HPLC par exemple).

Matériel et méthodes

1) Souches et milieux de culture

Les différentes souches bactériennes et de levure utilisées lors de ce stage sont indiquées dans le tableau 1. Les milieux de cultures sont indiqués dans le tableau 2, les versions solides des différents milieux sont obtenues en ajoutant 20 g d'agar par litre de milieu. Les milieux ont été stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes, la liste des différents suppléments est indiquée dans le tableau 3, sauf indication contraire la concentration utilisée lors de chaque expérience est la concentration finale. Sauf indication contraire, les cultures liquides d'*Escherichia coli* ont été réalisées dans du milieu LB à 37 °C avec une agitation de 200 rpm et les cultures en milieu solide dans du milieu LA (version solide du LB), dans un incubateur à 37 °C. De même les cultures liquides de *Streptomyces* ont été réalisées dans du TSB, à 30 °C, avec une agitation de 200 rpm, les cultures en milieu solide ont été réalisées sur du milieu SFM ou TSA (version solide du TSB), à 30 °C. Les cultures liquides de levures ont été réalisée dans du milieu YPD, à 30 °C, avec une agitation de 200 rpm. Les cultures solides ont été réalisée dans du milieu SD-Trp, à 30 °C. Les différents antibiotiques sont ajoutés aux milieux lorsque cela est nécessaire.

2) Manipulation d'ADN

* Extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline

Les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées par la méthode de lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979). Dans le cas des ADN plasmidiques à séquencer, ils ont été extraits en utilisant le kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific™, site 5). Pour les ADN plasmidiques destinés à faire une simple vérification des constructions le protocole suivi est celui des Minipreps (Holmes and Quinley, 1981) ce protocole est similaire à celui de la lyse alcaline mais en utilisant des volumes de culture plus faibles.

*Digestion d'ADN

Les digestions d'ADN par des enzymes de restriction ont été réalisées selon les indications du fournisseur (Thermo Fisher Scientific™). Après chaque digestion, les enzymes de restrictions ont été inactivées par la chaleur selon les indications du fournisseur.

Tableau 1 : Liste des plasmides, BAC et souches utilisées

Nom	Génotype-Phénotype	Références
Plasmides		
pUZ8002	Kan ^R , <i>tra</i> , plasmide conjugatif porte le système pour la mobilisation en trans	Paget <i>et al.</i> , 1999
pCRISPR-Cas9	Apra ^R , Th ^R	Tong <i>et al.</i> , 2015
pCAP03	Apra ^R , Kan ^R	Tang <i>et al.</i> , 2014
pSPM88T	Amp ^R , Apra ^R , OriT (source de la cassette de résistance à l'apramycine)	Bunet <i>et al.</i> , 2014
pOSK 11.11	Apra ^R , Th ^R Plasmide conjugatif contenant les gènes <i>xis</i> et <i>int</i> du plasmide pSAM2 (permet l'excision de la cassette)	Bunet <i>et al.</i> , 2014
BAC		
pBeloBAC	Cm ^R	Kim <i>et al.</i> , 1996
BAA14ZC8	Cm ^R , BAC dérivé du pBeloBAC, venant de la banque d'ADN génomique de <i>S. ambofaciens</i> du laboratoire	Choulet <i>et al.</i> , 2006
BAA14ZC8 kan <i>Δsam0428::apra-oriT</i>	Kan ^R , <i>Δsam0428::apra-oriT</i> : dérive du BAAA14ZC8 mais la résistance au chloramphénicol a été remplacée par celle à la kanamycine, le gène <i>sam0428</i> a été remplacé par la cassette <i>apra-oriT</i> .	Projet en cours
<i>E. coli</i>		
ET12567	Cm ^R <i>dam</i> -13 :Tn9, <i>dcm</i> -6, <i>hsdM</i>	Bierman <i>et al.</i> , 1992
DH5α	F- (φ80d <i>lacZΔM15</i>) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>thi</i> -1 <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r-k,m+k) <i>gyrA96</i> <i>supE44</i> λ-	Hanahan, 1983
<i>Streptomyces ambofaciens</i>		
ATCC 23877	Souche sauvage, productrice de stambomycine, congocidine, kinamycine, spiramycine et antimycine	Pinnert-Sindico, 1954
OSC5	Souche dérivée de la souche sauvage sans le plasmide pSAM2, ne produit plus aucun des antibiotiques cités au-dessus	Projet en cours
OSC6 bis	souche dérivée de la souche OSC5 délétée dans le gène <i>sam0428</i> (NRPS antimycine)	Projet en cours
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
VL6-48N	MAT α, <i>his3-D200</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>ura3-Δ1</i> , <i>lys2</i> , <i>ade2-101</i> , <i>met14</i> , <i>psi+cir⁰</i>	Tang <i>et al.</i> , 2015

Tableau 2 : Composition des différents milieux utilisés

Nom	Composition (1 L)	Référence
ISP2	4 g extraits de levure, 4 g extraits de malt, 4 g glucose, 20 g agar	Wickerham and Burton, 1948
LB	10 g peptone, 5 g extraits de levure, 10 g NaCl, pH 7	Bertani, <i>et al.</i> , 1951
MM	0,5 g L-asparagine, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,2 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,01 g FeSO ₄ .7H ₂ O, Ajuster Ph 7, après autoclavage, ajouter 0,5 % de mannitol	Hopwood, 1967
SD-Trp	182 g sorbitol, 22 g dextrose, 20 g agar	Tang <i>et al.</i> , 2015
SFM (MS)	20 g mannitol, 20 g farine de soja, 20 g agar	Hobbs <i>et al.</i> , 1989
TSB	17 g digestion pancréatique de caséine, 3 g digestion pancréatique de semoule de soja, 2,5 g glucose, 5 g NaCl, 2,5 g K ₂ HPO ₄ .	Kieser <i>et al.</i> , 2000
YPD	20 g D-glucose, 10 g extraits de levure, 20 g de peptone	Sherman, 1991
2xYT	16 g tryptone, 10 g extraits de levure, 5 g NaCl	Kieser <i>et al.</i> , 2000

Tableau 3 : Liste des suppléments

Nom	Composition	Concentration finale
5 FOA (acide 5 fluoro-orotique)	100 mg/ml dissous dans du DMSO 100%	1 mg/ml
Acide nalidixique	25 mg/ml dissous dans 0,15 M de NaOH	25 µg/ml
Apramycine	50 mg/ml dissous dans de l'eau	50 µg/ml
Ampicilline	200 mg/ml dissous dans de l'eau	100 µg/ml
Chloramphénicol	100 mg/ml dissous dans de l'éthanol 100%	50 µg/ml
Kanamycine	100 mg/ml dissous dans de l'eau	50 µg/ml
N-acétylglucosamine	Poudre à diluer dans de l'eau	20 mM
Thiostrepton	50 µg/ml dissous dans du DMSO 100%	50 µg/ml

*PCR

Les amorces sont indiquées en annexe 1, le mélange réactionnel et les conditions de PCR sont indiqués dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé pour chaque PCR réalisée au cours de ce stage

Produit	Quantité utilisée (Dream Taq®)	Quantité utilisée (Taq phusion®)
Tampon	Qsp 1 X	Qsp 1 X
dNTP (2,5 mM)	2,5 µl	2,5 µl
Amorce sens (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Amorce antisens (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
DMSO		2 µl
Bétaïne	1,25 µl	
ADN	Entre 50 et 100 ng	Entre 50 et 100 ng
Taq	0,125 µl	0,2 µl
Eau	Qsp 25 µl	Qsp 25 µl

Certaines PCR ont été réalisées directement sur colonie : pour les *Streptomyces* la moitié de la colonie est prélevée à l'aide d'un cure-dents stérile puis placée dans un microtube contenant 10 µl de DMSO. Le mélange est bouilli 10 minutes à 100 °C dans un bain sec, puis 1,5 µl de ce mélange est ajouté au tube PCR. Pour les PCR sur colonies d'*E. coli*, la moitié de la colonie est prélevée avec un cure-dents stérile, puis placée directement dans le tube PCR, la première étape du cycle est suffisante pour lyser les bactéries. La Dream Taq® était utilisée dans les PCR de vérification, la Taq phusion® est une Taq haute-fidélité qui était utilisée lorsque les produits PCR devaient être clonés.

Tableau 5 : Conditions des différentes PCR utilisées au cours de ce stage

Etape	Condition	
Dénaturation initiale	4 minutes à 95 °C (Dream Taq®) 3 minutes à 98 °C (Taq phusion®)	
Dénaturation	40 secondes à 95 °C (Dream Taq®) 40 secondes à 98 °C (Taq phusion®)	} 35 X
Hybridation	30 secondes à Tm des amorces – 5 °C	
Polymérisation	1 minute/Kb à 72 °C (Dream Taq®) 30 secondes/Kb à 72 °C (Taq fusion®)	
Polymérisation finale	5 minutes à 72 °C	

*Electrophorèse

Les électrophorèses en gel d'agarose sont réalisées en tampon TBE (Tris-borate 0,09 M; EDTA 0,002 M). Le système de traitement d'images GelDoc 1000 (Biorad™) permet de visualiser les gels après immersion dans une solution de BET à 0,5 µg/ml, de traiter et de stocker les données. Les marqueurs de taille utilisés sont les marqueurs 1Kb plus et 100 bp plus (Thermo Fisher Scientific™).

*PFGE

La préparation d'ADN de *S. ambofaciens* pour les électrophorèses en champs pulsés ou PFGE est réalisée suivant la méthode décrite par Leblond *et al.* (1990) et les migrations sont faites dans une cuve Bio-Rad de type CHEF ("Contour clamped Homogeneous Electric Field") (Chu *et al.*, 1986).

*Séquençage

Le séquençage est réalisé par une société extérieure au laboratoire (Genewiz, basée en Angleterre), les échantillons sont préparés comme suit : 15 µL d'ADN (100 ng/µl) à séquencer sont envoyés avec 10 µl de chaque amorce (5 µM).

*Ligation

Pour toutes les ligations 50 ng de plasmide ont été utilisés, la quantité d'insert à ajouter est obtenue par l'équation suivante :

$$\text{Quantité vecteur (ng)} * \frac{\text{Taille insert (bp)}}{\text{Taille vecteur (bp)}} * \text{ratio} \frac{\text{vecteur}}{\text{insert}} = \text{Quantité insert (ng)}$$

Le ratio utilisé est de 10 inserts pour un vecteur, les deux ADN sont mélangés avec 1 µl de tampon de ligation 10X, 5 unités de ligase T4 et le volume d'eau nécessaire pour obtenir un volume final de 10 µL. Le mélange est laissé à température ambiante sur la nuit.

*Transformation par choc thermique

L'ADN à transformer est mélangé avec des cellules d'*E. coli* DH5α chimiocompétentes préparées selon le protocole de Hanahan (1983), le mélange est mis à incuber 20 minutes sur glace puis subit un choc thermique : 90 secondes à 42 °C. Il a immédiatement été replongé dans la glace. Après 2 minutes d'incubation dans la glace, 600 µl de LB froid sont ajoutés, puis la culture cellulaire est placée dans un incubateur à 37 °C sous agitation pendant une heure. Les cellules sont

concentrées par centrifugation puis étalées sur une boîte de LB complétée avec l'antibiotique adéquat. La boîte est alors placée à 37 °C sur la nuit.

***Clonage par Gibson Assembly®**

50 ng de vecteur digéré sont ajoutés à l'insert en concentration équimolaire et à un volume correspondant à la moitié de la réaction de Master Mix 2X. Le mélange est mis immédiatement dans la glace puis dans un thermocycleur réglé à 50 °C pendant 40 minutes. Il est remis immédiatement dans la glace, puis la totalité du volume est utilisé pour réaliser une transformation par choc thermique d'*E. coli* chimiocompétentes.

***Conjugaison intergénérique**

Les différents plasmides pCRISPR-Cas9 et pCAP03 ainsi que le BAC BAA14ZC8 $\Delta sam0428::apra-oriT$ ont été transférés chez *S. ambofaciens* par conjugaison intergénérique à l'aide de la souche *E. coli* ET12567/pUZ8002 (le plasmide pUZ8002 permet la mobilisation en trans des différents plasmides cités au-dessus). A partir des souches *E. coli* contenant les plasmides d'intérêt, une préculture est lancée sur la nuit (10 ml LB complété avec les antibiotiques adéquats), 100 μ l de cette préculture sont ensuite inoculés dans une flasque Erlenmeyer contenant 40 ml de LB complété avec les mêmes antibiotiques. Lorsque la culture a atteint une DO_{600nm} de 0,6, les cellules ont été lavées deux fois avec 40 ml de LB sans antibiotique. Lors du deuxième lavage, approximativement $5 \cdot 10^8$ spores de *S. ambofaciens* sont mises en suspension dans 500 μ l de 2xYT et placées 10 minutes à 50°C. Les bactéries *E. coli* lavées sont ensuite resuspendues dans 2 à 3 ml de LB puis mélangées avec les spores (500 μ l de chaque culture). Les cellules sont concentrées par centrifugation puis inoculées sur milieu gélosé SFM complété avec 10 mM $MgCl_2$. Entre 16 et 20 h plus tard, la boîte est recouverte avec 1 ml d'eau ultrapure stérile contenant l'antibiotique dont la résistance est portée par le plasmide que l'on souhaite transférer à *Streptomyces* ainsi que de l'acide nalidixique pour tuer *E. coli* (on parle d'overlay).

3) Construction du mutant OSC6 bis

Le mutant *S. ambofaciens* OSC6bis a été obtenu en remplaçant le gène *sam0428* par une cassette de résistance à l'apramycine en réalisant une conjugaison intergénérique avec une souche *E. coli* portant le bac BAA14ZC8 $\Delta sam0428::apra-oriT$. Les exconjugants ont ensuite subi une autre

conjugaison avec une souche *E. coli* portant le plasmide pOSK 11.11 afin d'exciser la cassette de résistance à l'apramycine du génome du mutant.

4) Excision d'îlot génomique grâce au système CRISPR-Cas 9

L'îlot génomique est excisé en utilisant un système développé par Tong et ses collaborateurs basé sur le système CRISPR (Tong *et al.*, 2015).

Les différentes constructions intermédiaires sont testées par PCR et séquençage.

L'induction de l'expression de Cas 9 chez *S. ambofaciens* est obtenu en striant les exconjugants sur du milieu ISP2 contenant du thiostrepton (1 µg/ml) et de l'apramycine puis en incubant les boîtes 5 à 7 jours à 30°C. Les colonies obtenues sont ensuite striées de manière à obtenir des clones isolés sur des boîtes contenant du TSA sans antibiotique. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C pendant 2 à 3 jours ce qui permet la perte du plasmide car l'origine de réplication utilisée par *Streptomyces* est thermosensible. Les différents mutants obtenus seront testés par PCR afin de vérifier la perte de l'îlot génomique.

5) Expression hétérologue d'un îlot génomique en utilisant le système TAR

L'expression hétérologue des différents îlots génomiques sélectionnés est obtenue en suivant le protocole de Tang et de ses collaborateurs (Tang *et al.*, 2015).

En ce qui concerne la digestion de l'ADN génomique, 200 µg sont digérés par une enzyme qui coupe au plus près de l'îlot cible mais qui n'a pas de site de restriction à l'intérieur de ce dernier.

Par la suite 0,2 µg de vecteur et 2 µg d'ADN génomique ont été utilisés pour la transformation des sphéropastes obtenus en digérant *S. cerevisiae* VL6-48N par du zymolyase.

Les transformants obtenus subiront ensuite une extraction d'ADN plasmidique pour récupérer les vecteurs qui seront testés par PCR.

Résultats

1) Construction du mutant OSC6 bis

Un des objectifs de ce stage était d'obtenir un mutant de *S. ambofaciens* ATCC23877 déficient dans la production de tous les métabolites secondaires connus qui possèdent une activité antimicrobienne. La souche OSC5, déficiente dans la production de kinamycine, congocidine, spiramycine et stambomycine était déjà disponible lorsque le stage a débuté. La dernière étape était de construire un mutant déficient dans la production de l'antimycine à partir de la souche OSC5. Pour se faire il a été décidé de déléter le gène *sam0428* qui est le gène codant la NRPS du cluster responsable de la synthèse de l'antimycine, un cluster hybride PKS/NRPS (Seipke *et al.*, 2011).

Lors d'un premier essai, plusieurs mutants OSC6 bis ont été obtenus, les différentes étapes de leur construction sont détaillées plus bas.

***Réarrangement chromosomique dans la souche parentale**

S. ambofaciens est une souche qui présente un phénomène d'instabilité important et cela se traduit notamment par des réarrangements chromosomiques dans les régions terminales du chromosome qui sont dispensables en conditions de laboratoire (Leblond *et al.*, 1990). Afin de vérifier l'absence de réarrangements de grande taille, les premiers mutants OSC6 bis obtenus ont été analysés par PFGE (voir matériel et méthodes) après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction *AseI* (expérience réalisée par Laurence Hôtel, technicienne au laboratoire). Le site reconnu par *AseI* est un site riche en bases A et T et est donc rare dans le chromosome de *S. ambofaciens* (72% de GC). L'analyse des résultats obtenus par PFGE montrent que les clones 3, 4 et 5 présentent une délétion d'une partie du bras chromosomique droit. En fait, le gène *sam0428* et la cassette *apra-oriT* utilisée pour son remplacement ne possédant pas de site reconnu par *AseI*, le profil attendu pour ces mutants devait être le même que celui obtenu pour la souche parentale. Or, comme observé sur les pistes 3, 4 et 5 (Figure 6 A), le profil des souches mutantes révèle l'absence des fragments *AseI* K et L ce qui indique une délétion de grande taille au niveau de la région chromosomique droite.

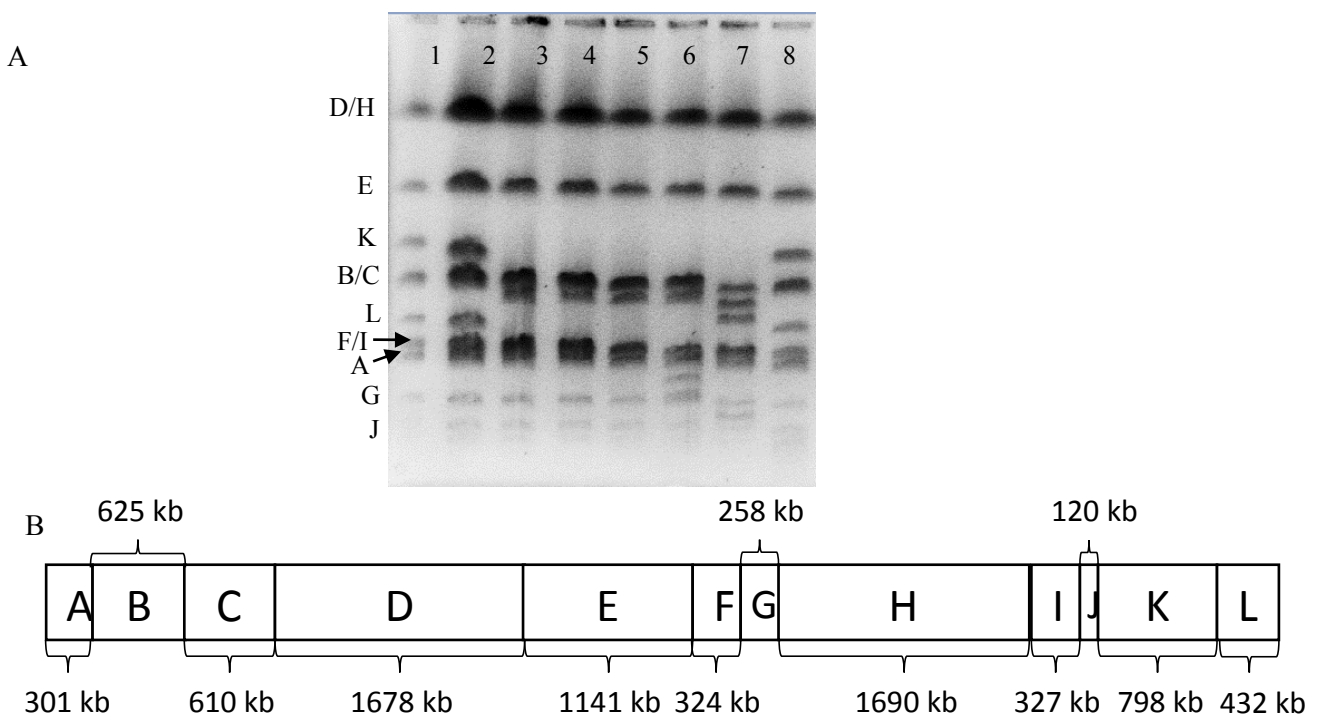


Figure 6 : Vérification de l'intégrité chromosomique des différents mutants

A) Migration des digestions *AseI* des ADN des différents mutants : les conditions de migration sont celles indiquées dans le matériel et méthode dans la partie PFGE.

S. ambofaciens OSC2 (souche parentale de référence)

2 : *S. ambofaciens* OSC4 Δ sam7126::kan (mutant OSC4 dans lequel le gène 7126 du cluster responsable de la synthèse de la stambomycine a été remplacé par une cassette kan)

3-5 : différents clones OSC5

6 : *S. ambofaciens* OSC6

7 : *S. ambofaciens* OSC6 bis

8 : *S. ambofaciens* OSC4

B) Carte de restriction *AseI* du génome de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Les rectangles correspondent aux différents fragments obtenus par digestion *AseI* et sont désignés par une lettre (A à L).

Afin d'identifier à quel niveau a pu avoir eu lieu ce réarrangement chromosomique, une analyse par PFGE a également été réalisée sur la souche parentale OSC5. Si on compare les profils obtenus par les clones OSC5 et celui obtenu par le clone OSC4 Δ sam7126::kan (mutant OSC4 qui contient encore la cassette de résistance à la kanamycine utilisée pour remplacer le gène *sam7126*), on remarque des profils différents. Or ils ne devraient pas être aussi différents, en effet le clone OSC5 est le clone qui est obtenu après excision de la cassette de résistance à la kanamycine, cette cassette ne contenant pas de site *AseI*, il ne devrait pas y avoir de différence dans les profils de digestion de ces deux mutants. La souche OSC4 Δ sam7126::kan a un profil similaire à celui de la souche OSC4, ce qui indique qu'il n'y a pas de remaniement dans cette souche. Le remaniement a donc eu lieu dans le clone issu de l'excision de la cassette, qui a été utilisé pour la construction de la souche OSC6 bis. Il a donc été décidé de refaire le mutant OSC5 à partir du mutant OSC4 Δ sam7126::kan. Ce mutant a été obtenu par le Dr Cláudia Morgado Vincente, et j'ai de nouveau réalisé la construction du mutant OSC6 bis à partir de ce clone. Cette nouvelle souche parentale a été vérifiée par PFGE et ne montre pas de réarrangement chromosomique.

*Remplacement de *sam0428* par une cassette de résistance chez *S. ambofaciens* OSC5

La stratégie suivie pour la construction du mutant OSC6 bis est illustrée dans la figure 7.

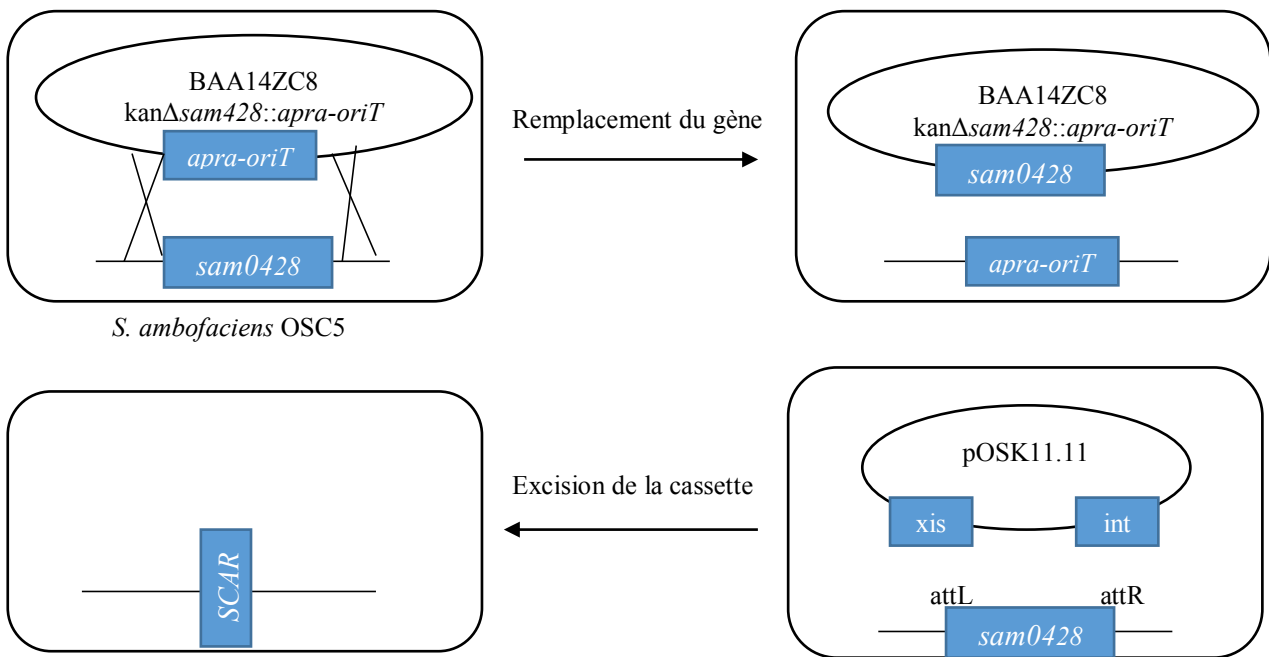


Figure 7 : Construction du mutant OSC6 bis

Ce schéma représente les différentes étapes de la construction du mutant OSC6 bis : la première étape est le remplacement du gène *sam0428* par la cassette *apra-oriT* (en haut), ce remplacement se fait par double crossing-over de part et d'autre du gène. Ce double crossing-over est possible car le BAC contient le cluster des gènes de biosynthèse de l'antimycine et donc possède les régions bordant le gène *sam0428*. La deuxième étape est l'excision de la cassette par l'action des produits des gènes *xis* et *int* portés par le plasmide *pOSK11.11* qui vont exciser la cassette en utilisant les sites *attL* et *attR* situés de part et d'autre de la cassette.

Le BAC BAA14ZC8 *kan Δsam0428::apra-oriT* est un BAC contenant le cluster des gènes responsables de la synthèse de l'antimycine mais dans lequel le gène *sam0428* est remplacé par la cassette *apra::oriT*. Ce BAC était déjà disponible avant mon arrivée au laboratoire. Le BAC a d'abord été introduit par électroporation dans la souche *E. coli* ET12567/*pUZ8002* qui est déficiente pour la méthylation ce qui permet de contourner les systèmes de restriction-modification présents chez *S. ambofaciens* lors de la conjugaison. Le plasmide *pUZ8002* comporte le système nécessaire à la mobilisation à trans d'éléments génétiques porteurs d'une séquence *oriT* (origine de transfert) lors de la conjugaison. Les transformants issus de cette électroporation ont été sélectionnés sur LA complémenté avec de la kanamycine (présence du BAC) et de l'ampicilline (présence du plasmide *pUZ8002*). Ensuite un de ces clones a été utilisé pour la conjugaison intergénérique avec *S. ambofaciens* OSC5. Les exconjugants obtenus sont ensuite sélectionnés sur du TSA complémenté avec de l'apramycine puis ils ont été repiqués sur du TSA complémenté avec de la kanamycine. Le BAC ne peut pas se répliquer de manière autonome chez *S. ambofaciens* car il ne possède pas d'origine de répllication pour cet organisme. La seule façon d'acquérir la résistance à l'antibiotique est que le BAC soit intégré dans le chromosome de *S. ambofaciens*. Seules les bactéries qui poussent

sur apramycine mais pas sur kanamycine sont sélectionnées car elles ont le gène *sam0428* remplacé par la cassette sans avoir le reste du BAC intégré dans leur génome. Le remplacement du locus *sam0428* chez les exconjugants [*apra^R/kan^S*] a été vérifié par PCR avec le couple d'amorces L376 amont et L376 aval (annexe 1) qui s'apparient à 55 pb et 19 pb en amont et en aval respectivement de *sam0428*. La taille attendue des produits PCR chez le sauvage est de plus de 8,7 Kb, chez le mutant elle est de 2,9 Kb (figure 8)

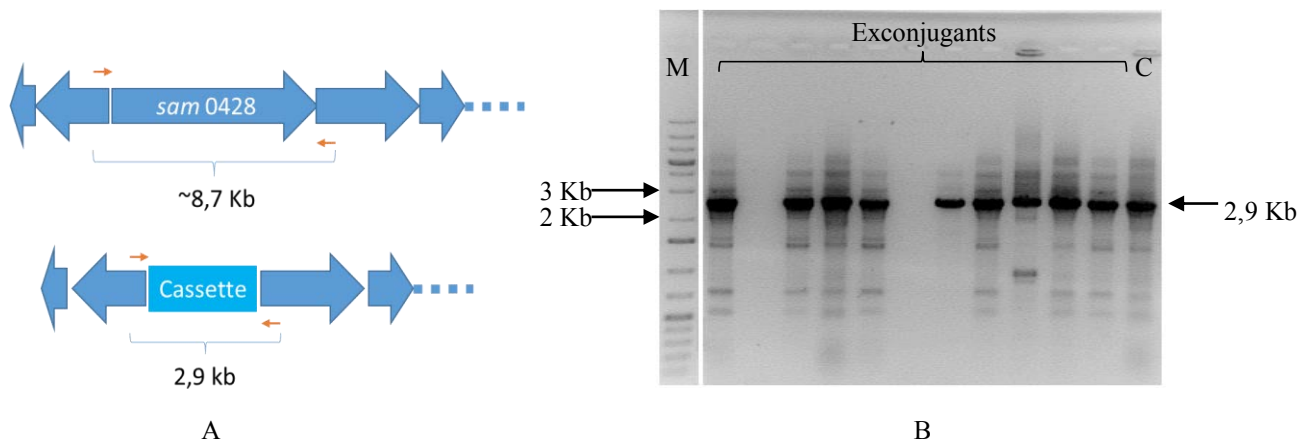


Figure 8 : Vérification du remplacement du gène *sam0428* par la cassette *apra-oriT*

A) Représentation graphique des tailles attendues, les flèches rouges représentent les amorces utilisées dans la PCR

B) Migration de la PCR de vérification, le gel est réalisé en TBE avec 0,8 % d'agarose à 80 V.

M : marqueur de taille (1 Kb plus, Thermo Scientific™)

C : contrôle (BAC BAA14ZC8 kan Δ *sam0428*::*apra-oriT*)

Dans le cas des exconjugants dans lesquels le gène *sam0428* est conservé, les conditions de PCR utilisées ne permettent pas l'amplification de ce gène car il est trop grand pour être amplifié (8,7 Kb). Dans le cas des exconjugants dans lesquels le gène a été remplacé par la cassette, la PCR permettra l'amplification de la cassette qui se manifeste par une bande de 2,9Kb. Par conséquent, les clones présentant une bande à 2,9 Kb sont considérés comme positifs. Neufs exconjugants sur les 11 testés sont positifs. Deux exconjugants positifs sont sélectionnés pour l'étape suivante et seront nommés OSC6 bis 7 et 37.

*Excision de la cassette de résistance à l'apramycine

Afin d'éliminer la cassette de résistance à l'apramycine, les souches OSC6 bis obtenues ont été transformées par le plasmide pOSK11.11 par conjugaison intergénérique à partir de la souche d'*E. coli* ET12567/pUZ8002. Le plasmide pOSK11.11 contient les gènes *xis* et *int* de l'ICE (Integrative and Conjugative Element) pSAM2 codant respectivement l'excisionase (Xis) et l'intégrase (Int) site-spécifique de l'élément. La cassette *apra-oriT* est flanquée par les sites d'attachement *attR* et *attL* reconnus par Xis et Int, l'expression de ces protéines chez les souches *S. ambifaciens* OSC6 bis obtenues précédemment doit se traduire par la délétion de la cassette par recombinaison site-

spécifique. Les exconjugants obtenus sont sélectionnés sur du TSA complété avec du thiostrepton et de l'acide nalidixique puis la perte de la cassette est testée sur des boîtes TSA complétée avec de l'apramycine. Pour vérifier la perte de cette cassette au niveau moléculaire, l'ADN des clones a été extrait puis analysé par PCR avec les mêmes amorces qui ont servi à vérifier le remplacement du gène *sam0428* par la cassette *apra-oriT*. La taille attendue du produit si la cassette est excisée est de 110 pb, l'excision laissant une séquence de type "attB-like" au locus chromosomique (figure 9).

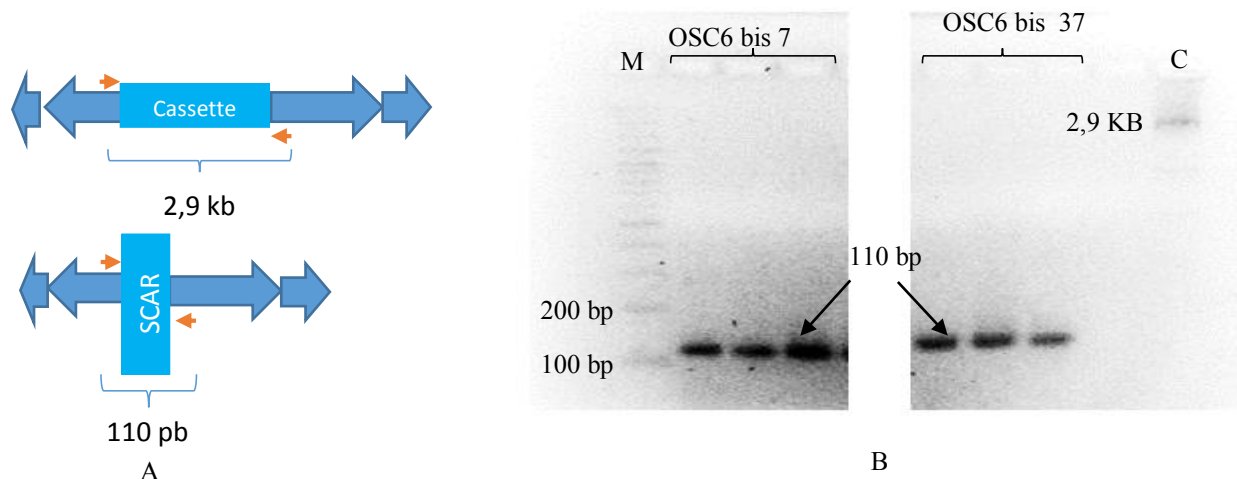


Figure 9 : Excision de la cassette *apra-oriT*

A) Schéma montrant les tailles de bandes attendues, les flèches rouges représentent les amorces utilisées.
 B) Migration des produits PCR obtenus. Le gel d'électrophorèse a été réalisé en TBE avec 2 % d'agarose, la migration a été réalisée à 100 V.

M : Marqueur de taille (100 bp plus, Thermo Scientific™)

C : BAC BAA14ZC8 kan Δ *sam0428*::*apra-oriT*

Taille attendue : 110 bp.

La taille attendue de 110 pb correspond à l'amplification de la courte séquence créée lors de l'excision de la cassette (le SCAR ou séquence "attB-like"), ainsi que des régions comprises entre le SCAR et les amorces. Tous les clones testés présentent une amplification dont la taille correspond à la taille attendue (110 paires de bases). Une PCR de contrôle réalisée avec l'ADN du BAC BAA14ZC8 kan Δ *sam0428*::*apra-oriT* révèle une bande à 2,9 Kb qui correspond à l'amplification de la cassette. Les conditions de PCR étant les mêmes, le fait que les clones ne présentent pas de bande à 2,9 Kb implique que la cassette a bien été excisée dans ses clones. Quatre clones indépendants, venant des 2 souches parentales (les clones 7.2, 7.10, 37.4 et 37.9), ont été utilisés pour la suite des expériences. Tous les clones sont ensuite inoculés sur SFM pour préparer des sporées.

*Test d'activité OSC6bis

Afin de tester l'activité antagoniste de ces clones, 10^8 spores de chaque clones ont été ensemencées sur du milieu minimum et du milieu minimum complétement avec du N-acétylglucosamine à 20 mM et laissées à incuber 6 jours à 30°C. Après cette période d'incubation, des plugs sont prélevés afin de tester l'activité contre la souche *Micrococcus luteus* (figure 10).

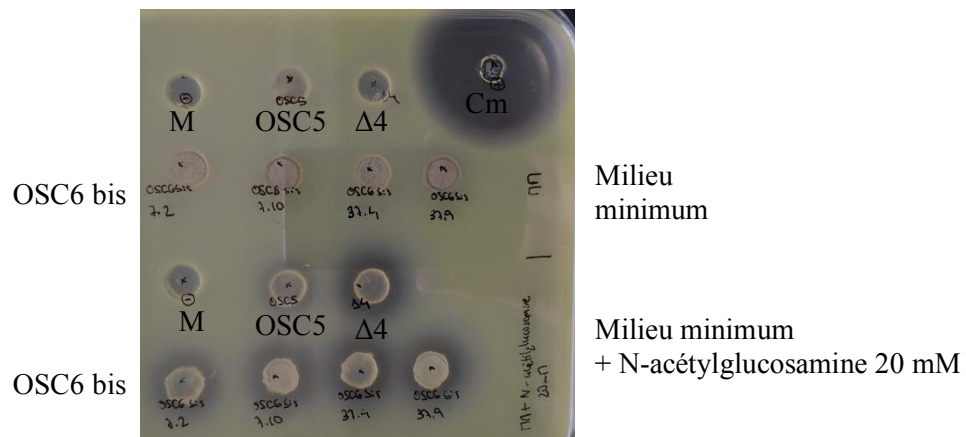


Figure 10 : Test d'activité OSC6 bis contre *Micrococcus luteus*

Cm : 2 μ l chloramphénicol (10 mg/ml)

M : milieu

OSC6 bis (de gauche à droite) : 7.2, 7.10, 31.4, 31.9

Dans ce test d'activité plusieurs contrôles ont été utilisés : dans le coin supérieur droit ont été déposés 2 μ l d'une solution de chloramphénicol (10 mg/ml), ce contrôle est un témoin positif d'inhibition de croissance car la souche est sensible au chloramphénicol. Un autre contrôle utilisé est le plug de milieu, c'est un contrôle négatif montrant que l'activité observée n'est pas liée à un composant du milieu mais bien à la bactérie présente sur le plug. Les souches OSC5 et $\Delta 4$ (autre mutant de *S. ambofaciens* qui est déficient pour la synthèse des mêmes composés que la souche OSC5) sont des contrôles positifs montrant une inhibition de croissance lorsqu'ils sont cultivés en milieu minimum complétement avec 20 mM de N-acétylglucosamine. On remarque que l'ensemble des clones OSC6 bis testés ont une activité contre *M. luteus* dans les mêmes conditions ce qui montre bien que le mutant OSC6 bis possède une activité contre ce microorganisme qui n'est pas liée à un cluster de gènes de biosynthèse classique.

2) Délétion d'ilots génomiques avec le système CRISPR-Cas9

L'un des objectifs de mon stage était de déléter des ilots génomiques présents chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 à partir du mutant OSC5 afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle l'activité provient d'un cluster de gènes de biosynthèse de métabolite secondaire qui serait est porté

par un îlot génomique. La stratégie de délétion utilisée était basée sur l'utilisation du système CRISPR-Cas9.

*Principe de la méthode CRISPR-Cas9

Le principe de fonctionnement du système CRISPR-Cas9 est illustré dans la figure 11.

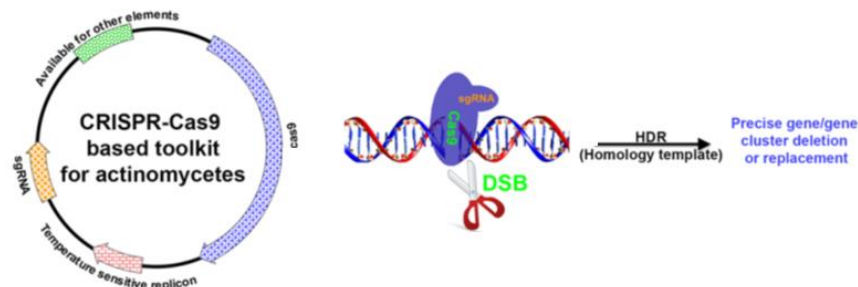


Figure 11 : Principe de fonctionnement du système CRISPR-Cas9 (d'après Tong et al., 2015)

Le plasmide à gauche de la figure contient le gène responsable de la synthèse de la nucléase Cas9 ainsi que le gène codant l'ARNsg (sgRNA sur la figure). La nucléase se fixe au niveau de la séquence cible grâce à l'ARNsg puis coupe les deux brins d'ADN (DSB sur la figure). Grâce à des fragments d'homologie (Homology template), ce système permet une délétion ou un remplacement précis d'un gène ou d'un cluster de gène.

Le système CRISPR-Cas9 repose sur l'utilisation de la nucléase Cas9 qui peut couper les deux brins d'un ADN qui est sous la forme d'un hétérodimère avec un ARN. Ce système permet de cibler le site de coupure grâce à un ARN qui se fixe spécifiquement sur la séquence ciblée : l'ARNsg. La séquence ciblée est une séquence de 20 nucléotides spécifique de la région ciblée, précédée par une séquence PAM (protospacer adjacent motif) de trois nucléotides (NGG).

Dans le cadre de mon stage, cet outil va être utilisé pour la délétion d'îlot génomique, la séquence cible est une séquence qui se trouve dans le gène situé plus ou moins au centre de l'îlot. Afin de déléter tout l'îlot génomique suite à une coupure double brin dans l'îlot, des fragments d'ADN homologues aux régions bordant l'îlot sont ajoutés au vecteur. Ces fragments (appelés également bras d'homologie) vont servir de matrice au système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue : il va y avoir formation d'un crossing over entre les fragments d'homologie portés par le vecteur et les régions flanquant l'îlot ce qui entraînera la perte de l'îlot génomique.

Le vecteur pCRISPR-Cas9 (figure 15, annexe 2) porte un site de clonage pour les ARNsg. L'expression des ARNsg est constitutive car elle est sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (*PermE*). Le plasmide porte également le gène *cas9* dont l'expression est régulée par le promoteur *tipAp* qui est inductible par le thiostrepton (Murakami et al., 1989). Ainsi l'expression de ce gène n'est obtenue que lorsque l'on cultive les bactéries portant ce plasmide dans un milieu contenant du thiostrepton. Lorsqu'elle est induite, Cas9 va se fixer sur les hétérodimères ARNsg/ADN puis va couper les deux brins d'ADN en cette position. Le vecteur porte également le gène de résistance à

l'apramycine ce qui permet de sélectionner les bactéries qui le portent, il contient également le gène de résistance au thiostrepton L'origine de répllication utilisée par *S. ambofaciens* est thermosensible ce qui permet d'éliminer le plasmide une fois la délétion effectuée.

*Choix des ilots génomiques

Les ilots génomiques ciblés ont été sélectionnés en se basant sur l'homologie de séquence des gènes qu'ils contiennent. Les ilots sélectionnés pour cette approche sont les ilots A6002 et A6007. L'ilot A6002 a été choisi car il contient des gènes codant des enzymes de modification (méthyltransférase, oxydoréductase...) ainsi qu'un régulateur transcriptionnel, or ce type de gènes peut être associé à des loci impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires. L'ilot A6007 contient un gène dont la séquence est proche du gène codant le transporteur de l'actinorhodine (antibiotique) chez *S. coelicolor*, six régulateurs transcriptionnels ainsi qu'une polycétide cyclase/déhydrase. Tous ces indices montrent que ces deux ilots sont de bons candidats.

*Choix des différents ARNsg

Le choix des ARNsg a été fait avant le début de mon stage. Il repose sur l'utilisation du logiciel CRISPR-Target qui permet de trouver toutes les séquences de 20 nucléotides placées juste à côté d'une séquence PAM (NGG). Il a été décidé de cibler un gène au centre de chaque ilot génomique et de réaliser trois ARNsg par ilot car on ne peut pas prédire l'efficacité de chaque ARNsg à induire une cassure double brin via l'action de l'enzyme Cas9 (figure 12).

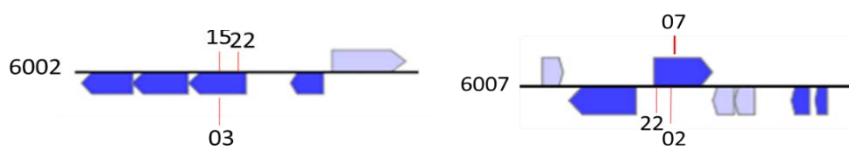


Figure 12 : Position des différents ARNsg

Ce schéma représente une partie des deux ilots choisis (A6007 et A6002), les positions marquées avec un trait rouge correspondent à la position des différents ARNsg utilisés.

*Amplification de l'ADN codant les ARNsg

Afin d'obtenir des plasmides contenant un ARNsg spécifique, une amplification par PCR de l'ADN codant les différents ARNsg a été réalisée en utilisant le plasmide pCRISPR-Cas9 comme matrice. Les amorces utilisées (annexe 1) comportent une partie homologue avec le plasmide au niveau du locus ARNsg, une partie contenant la séquence cible de 20 nucléotides et un site de restriction au niveau de l'extrémité 5' (*NcoI* pour l'amorce sens et *SnaBI* pour l'amorce antisens).

*Amplification des bras d'homologie

Ces fragments ont été obtenus par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche sauvage comme matrice. Par la suite les bras d'homologie ont été fusionnés par PCR, puis intégrés dans le plasmide pJET 1.2 Blunt du kit CloneJET PCR de thermo Fischer™ (site 6, annexe 2) par ligation. Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans la souche *E. coli* DH5α par choc thermique, les transformants ont été sélectionnés sur LA complété avec de l'ampicilline. Les différents clones obtenus ont alors été vérifiés par digestion enzymatique : l'ADN plasmidique a été extrait puis digéré par l'enzyme *Bgl*II (figure 13).

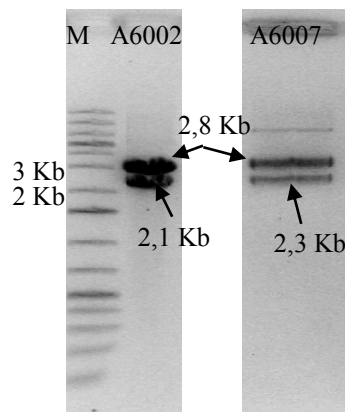


Figure 13 : Migration des digestions des vecteurs contenant les fragments d'homologie
M : marqueur de taille (1 Kb plus)

Taille attendue :

-2,1 (insert) et 2,8 Kb (plasmide) pour l'ilot A6002

-2,3 (insert) et 2,8 Kb (plasmide) pour l'ilot A6007

Gel réalisé en TBE, 1 % d'agarose, 80 V

L'enzyme *Bgl*II a été utilisée car il y a un site *Bgl*II de chaque côté de l'insert cloné dans le site de clonage. On a bien le profil de digestion attendu pour les deux constructions à savoir une bande à 2,8 Kb et une à 2,1 Kb pour les bras d'homologie de l'ilot A6002 et une bande à 2,8 Kb et une à 2,3 Kb pour les bras d'homologie de l'ilot A6007. La bande supplémentaire observée dans le gel de droite pourrait être du plasmide non digéré. Le plasmide est par la suite digéré par *Bgl*II, les extrémités cohésives générées par la digestion sont rendues franches par l'utilisation de la polymérase Klenow (site 8).

*Obtention du plasmide spécifique

Le plasmide et le produit PCR des séquences codant les ARNsg sont digérés par *Sna*BI et *Nco*I. Par la suite une ligation est réalisée entre le plasmide digéré et un produit PCR digéré (un ARNsg par plasmide). Afin de vérifier que les transformants obtenus ont bien intégré le plasmide et que ce plasmide possède l'insert ARNsg, les transformants sont repiqués sur une boîte de LA complétée avec de l'apramycine puis testés par PCR en utilisant les amorces seq-ARNsg fw/rev (figure 14).

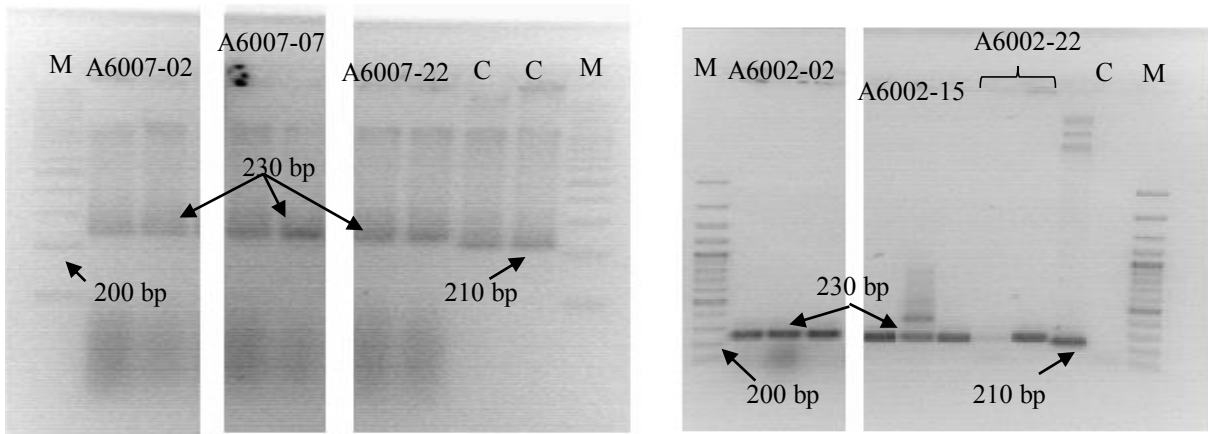


Figure 14 : Vérification des transformants obtenus par PCR

M : marqueur de taille (100 bp plus, Thermo Fischer™)

C : contrôle : plasmide pCRISPR-Cas9

Taille attendue : 230 pb

Gels réalisés en TBE, 2% d'agarose, 80 V.

J'ai testé 5 souches par ARNsg excepté l'ARNsg A6002-22 où je n'en ai testé que 2.

Les amorces utilisées flanquent la région codant l'ARNsg, la taille de 230 pb correspond à l'amplification de la région codant l'ARNsg plus les régions comprises entre cette séquence et les amorces. La différence de 20 nucléotides entre les clones positifs et le contrôle s'explique par le fait que les clones positifs ont intégré la séquence cible de 20 nucléotides. Les plasmides sont ensuite extraits pour vérifier la séquence de la construction par séquençage. Un plasmide de chaque construction a été envoyé au séquençage. Les séquences étaient correctes et ne montraient aucune mutation.

Les plasmides dont la séquence a été vérifiée sont digérés par *StuI*, puis le produit PCR des bras d'homologie contenu dans la portion digérée du vecteur pJET 1.2 BLUNT est intégré au plasmide digéré par *StuI* par ligation. Une fois le vecteur spécifique obtenu, sa séquence est vérifiée par séquençage.

*Transformation du plasmide dans *E. coli*

Les plasmides spécifiques obtenus ont été transformés dans *E. coli*, les transformants obtenus sont testés par digestion (par *XhoI* pour l'ilot A6002, par *NcoI* pour l'ilot A6007). Les enzymes diffèrent d'un ilot à l'autre car elles coupent une fois dans le vecteur et au moins une fois dans l'insert ce qui permet de différencier les clones positifs des clones négatifs. Le fragment d'homologie de l'ilot A6002 contient deux sites de restriction *XhoI* et le fragment d'homologie de l'ilot A6007 contient un site de restriction *NcoI*. Parmi les différents profils possibles on attend les suivants (figure 15) :

-7,9 Kb + 4,7 Kb + 826 bp (fragment d'homologie de l'ilotA6002)

-7,3 Kb + 6,4 Kb (fragment d'homologie de l'ilot A6007)

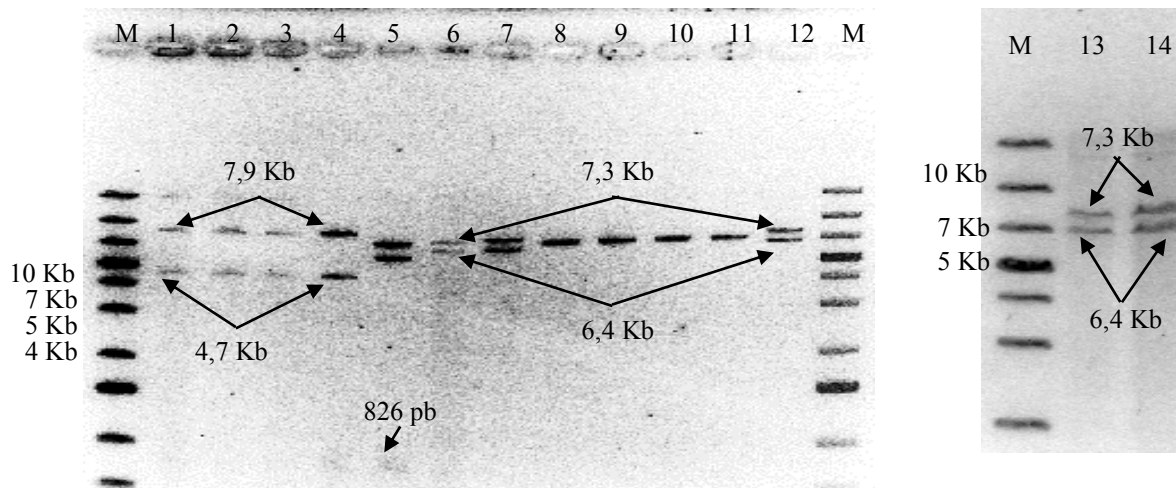


Figure 15 : Migration des digestions des plasmides extraits à partir des transformants

M : marqueur de taille (1 Kb plus)

1 : transformant portant pCRISPR-Cas9 A6002-15-HT

2 et 3 : transformants portant pCRISPR-Cas9 A6002-03-HT

4 et 5 : transformants portant pCRISPR-Cas9 A6002-22-HT

6 : transformant portant pCRISPR-Cas9 A6007-22-HT

7 à 12 : transformants portant pCRISPR-Cas9 A6007-02-HT

13 et 14 : transformants portant pCRISPR-Cas9 A6007-07-HT

Gels réalisés en TBE, 0,8% agarose, 80 V

Les clones 1 à 4 ont tous un profil correspondant à celui attendu, la bande à environ 800 paires de bases est très faible cependant en changeant le contraste elle devient visible dans ces puits (la qualité du gel ne permet pas de visualiser l'ensemble des bandes). Les clones correspondant sont donc positifs. Donc les clones 6, 7, 12, 13 et 14 sont considérés comme positifs. Les clones restant n'ont pas un profil correspondant à celui attendu, ils sont considérés comme négatifs.

*Délétion des ilots A6002 et A6007 chez *S. ambofaciens* OSC5

Les différents plasmides sont ensuite transférés dans la souche *S. ambofaciens* OSC5 par conjugaison intergénérique avec la souche *E. coli* ET112567/pUZ8002 contenant chacun de ces plasmides. Les exconjugants obtenus n'ont pas été sélectionnés car l'apramycine a été ajoutée dans l'overlay qui a été réalisé. Quarante exconjugants pour chaque construction ont alors été inoculés sur du milieu ISP2 contenant du thiostrepton (pour induire l'expression du gène *cas9*) et de l'apramycine pendant 6 jours. Un clone isolé de chaque exconjugant est ensuite repiqué sur du TSA sans antibiotique puis incubé trois jours à 37 °C pour entraîner la perte du plasmide. Les clones obtenus sont ensuite testés par PCR en utilisant les amorces qui ont servi à amplifier les bras d'homologie. Sur les 120 clones testés (40 par constructions), aucun ne présente d'amplification, seul le contrôle positif de chaque ilot présente une bande. Le fait que le contrôle positif présente

une bande à la taille attendue (2,1 Kb pour l'ilot A6002 et 2,3 Kb pour l'ilot A6007) qui correspond à l'amplification du scar laissé par l'excision de l'ilot, montre que la PCR a fonctionné.

3) Expression hétérologue d'ilots génomiques avec le système TAR

*Description du principe du système

Le principe de fonctionnement de ce système est illustré dans la figure 16.

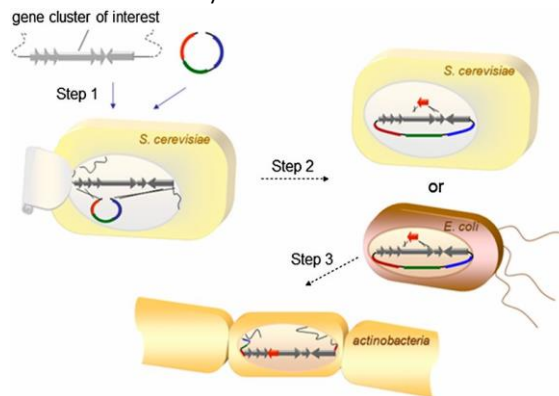


Figure 16 : Principe de fonctionnement du système TAR (Yamanaka et al., 2014)

Le plasmide et l'ADN génomique digéré contenant l'ilot à cloner sont transformés dans la levure. Le système de recombinaison homologue de ce microorganisme permet l'intégration de l'ilot génomique dans le vecteur grâce à la présence de fragments d'ADN homologues aux régions bordant l'ilot au niveau du plasmide. La construction est ensuite récupérée par extraction d'ADN plasmide puis transférée dans *E. coli* (step 2). Enfin la construction est transférée à la souche hôte par conjugaison entre *E. coli* et l'actinomycète hôte.

Ce système permet l'intégration d'un grand fragment d'ADN (ici un ilot génomique) dans un vecteur navette capable de se répliquer chez *S. cerevisiae*, chez *E. coli* et de s'intégrer dans le chromosome des actinomycètes. Le vecteur pCAPO3 (figure 16, annexe 2) porte la résistance à la kanamycine ce qui permet de sélectionner les bactéries qui le portent sur un milieu contenant cet antibiotique. Le système consiste à cloner les séquences flanquant l'ilot génomique étudié dans le vecteur, puis de co-transformer *S. cerevisiae* avec le vecteur linéarisé entre les deux séquences flanquant l'ilot et l'ADN génomique de *S. ambofaciens* digéré par une enzyme de restriction ne coupant pas dans l'ilot. La transformation se fait dans la levure car elles ont un système de recombinaison homologue efficace, ce qui permet ici d'intégrer un grand fragment d'ADN (ici l'ilot ciblé) dans le vecteur grâce aux régions homologues (séquences flanquant l'ilot). Le plasmide contient un système de contre-sélection : le gène *ura3* qui transforme le 5-FOA contenu dans le milieu de culture utilisé en un métabolite toxique pour la cellule. Ce gène *ura3* est sous le contrôle du promoteur pADH1, le gène et le promoteur sont placés de part et d'autre du site de clonage ce qui permet de sélectionner les clones positifs. L'intégration d'un fragment d'ADN plus grand que 130 paires de bases entre le promoteur et le gène ne permet pas à ce dernier de s'exprimer et donc le 5-FOA n'est pas transformé en un métabolite toxique. Les vecteurs qui n'ont pas intégré d'ilot et qui

seraient recircularisés expriment le gène *ura3* ce qui entraîne la mort de la cellule, les seules levures qui apparaissent sont donc celles qui ont intégré l'îlot. Ensuite les vecteurs sont récupérés, transformés dans *E. coli* puis introduits dans un *actinomyète* par conjugaison.

*Choix des îlots génomiques

Les deux îlots qui ont été étudiés en utilisant cette approche sont les îlots A6002 et A6058. L'îlot A6002 a été sélectionné en fonction de son contenu (déjà exposé dans la partie précédente), l'îlot A6058 lui contient cluster de gènes de PKS de type I, ce cluster a été ciblé car le métabolite qui lui est associé n'est pas connu (cluster cryptique).

*Amplification des fragments d'homologie

Cette approche nécessite la présence des régions flanquant l'îlot génomique sur le plasmide, pour ce faire ces régions ont été amplifiées par PCR puis fusionnées en un seul fragment par PCR (îlot A6058). Pour l'îlot A6002 ce produit PCR est remplacé par un ADN double brin synthétique. Chaque insert a été construit de manière à posséder un site *PmeI* en son centre ce qui permet de linéariser le vecteur.

*Construction du plasmide de capture spécifique

Le plasmide pCAP03 est digéré par les enzymes de restriction *XhoI* et *NdeI*. L'insert à cloner est intégré dans le plasmide digéré par Gibson Assembly®. La construction (appelée pCAP03 A6002-HT et pCAP03 A6058-HT) est ensuite transformée dans la souche *E. coli* DH5α. Les transformants sont sélectionnés sur LA complémenté en kanamycine, puis huit clones de chaque construction sont testés par PCR en utilisant les amorces pCap-seq fw et rev. La taille d'amplification attendue est de 400 paires de bases (figure 17).

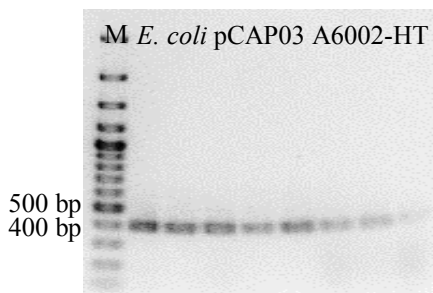


Figure 17 : Migration de la PCR de vérification des clones portant pCAP03 6002-HT

M : marqueur de taille (100 bp plus)

Gel réalisé en TBE, 2 % d'agarose, migration à 80 V

Sur le gel on observe que l'ensemble des clones testés présente une bande dont la taille correspond à la taille attendue. Dans le cas de l'îlot génomique A6058, les analyses par PCR ont

montré qu'aucun de clones analysés ne contenait l'insert. La fin du stage approchant cette construction n'a pas été refaite.

*Transformation du vecteur de capture dans la levure

L'ADN génomique de *S. ambofaciens* a été digéré par l'enzyme *AclI*. Le vecteur a été linéarisé en le digérant avec l'enzyme *PmeI*. Les sphéroplastes obtenus à partir de la levure *S. cerevisiae* sont ensuite transformés par l'ADN digéré (2 µg) et le vecteur linéarisé (0,2 µg) en suivant le protocole (Tang *et al.*, 2015).

Lors du premier essai, aucune levure n'a poussée même après 10 jours d'incubation. Un second essai de transformation a été réalisé mais au moment de la rédaction de ce manuscrit il était encore trop tôt pour observer si des transformants se développaient sur boîte.

Discussion, perspectives

1) Obtention du mutant OSC6 bis

La première partie de ce travail a consisté à construire une souche mutante dans le cluster responsable de la synthèse d'antimycine à partir de la souche parentale OSC5, une souche délétée dans chacun des clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires connus pour avoir une activité antibactérienne.

L'analyse par PFGE des mutants obtenus a cependant montré un réarrangement du chromosome de grande taille en plus du remplacement du gène par la cassette *apra-oriT*. Ce réarrangement se traduit par la perte des fragments *AseI* K et L soit plus de 1200 Kb sur un génome de 8,3 Mb (Thibessard *et al.*, 2015). La taille exacte n'a pas été déterminée, de même on ne sait pas si le chromosome s'est circularisé après ce réarrangement ou s'il est resté sous forme linéaire. Cependant ce réarrangement indique une chose : l'activité observée n'est pas liée à un cluster de gène de biosynthèse situé dans les fragments K ou L. Le réarrangement chromosomique observé dans la souche parentale n'est pas rare. En effet le chromosome de *S. ambofaciens* subit régulièrement ce genre de réarrangement au niveau de ses extrémités. Il a été démontré qu'il existe une zone chromosomique d'environ 2 Mb au niveau des extrémités du chromosome où ce genre d'événement est fréquent (Leblond and Decaris, 1994). Par la suite un mutant OSC6 bis a été reconstruit à partir d'un mutant OSC5 sans réarrangement et une analyse par PFGE a montré que ce mutant ne possédait pas de réarrangement chromosomique.

La souche OSC6 bis, dans lequel le gène codant la NRPS du cluster de biosynthèse de l'antimycine, le gène *sam0428*, a été correctement obtenue. Cette souche ne devrait donc pas produire d'antimycine mais pour démontrer que notre mutation empêche bien la production d'antimycine il aurait été préférable de réaliser un test d'activité entre la souche OSC6 bis et un champignon sensible à l'antimycine. Ou de réaliser un profil HPLC en co-injectant les différentes formes d'antimycine. Néanmoins il a été démontré que cette NRPS est essentielle à la synthèse des antimycines chez *S. ambofaciens* (Schoenian *et al.*, 2012) et chez *Streptomyces S4* (Seipke *et al.*, 2011).

Les tests d'activité réalisés en utilisant *M. luteus* comme que souche indicatrice et réalisés à des différents mutants OSC6 bis cultivés sur MM et MM + N-acétylglucosamine ont confirmé que l'activité observée n'était pas liée à la production d'antimycine. Comme décrit précédemment, cette activité serait liée à un ou plusieurs gènes de biosynthèse qui n'est (ne sont) pas détectable(s) par des recherches d'homologie de séquence car la souche est déficiente dans la production de tous les composés synthétisés par des clusters détectés de cette manière.

Cette souche sera très utile dans des études futures, elle permettra d'alléger les analyses des futurs mutants car ses mutants présenteront moins de bruit de fond, ils produiront moins de pics lors des tests par HPLC par exemple.

2) Délétion des îlots génomiques en utilisant la technologie CRISPR

Un des objectifs de mon stage était de vérifier si la délétion des différents îlots permet de lier l'activité observée à un îlot, ou si des différences entre les mutants obtenus et la souche parentale comme la production d'un métabolite secondaire qui serait visible par profilage chromatographique.

Les différents îlots génomiques identifiés par Syntheruptor® ont été classés, afin de leur donner un ordre de priorité car on ne peut pas tester tous les îlots en même temps. Cette classification s'est faite en se basant sur l'homologie de séquence des gènes contenus mais aussi en utilisant le logiciel antiSMASH. Les îlots qui ont des gènes intéressants et dont l'analyse par antiSMASH indique la présence d'un cluster de gènes dont les limites correspondent au moins en partie avec les limites définie par Syntheruptor® seront considérés comme les plus intéressants. Le logiciel antiSMASH est un outil permettant de détecter l'ensemble des clusters codant des métabolites secondaires au sein d'un génome en se basant lui aussi sur l'homologie de séquences (site 5). La version 3.0 permet de détecter de nouveaux clusters grâce à l'algorithme Cluster Finder (Weber *et al.*, 2015). Cet algorithme ne se base plus sur l'homologie de séquence entre les gènes

mais sur des motifs protéiques PFAM (séquences d'acides aminés conservées au sein des protéines de la même famille) possédés par les enzymes des différentes étapes de biosynthèse d'un métabolite secondaire (oxydoréductases, méthylases,...). Ce nouveau crible permet d'obtenir une liste de clusters probablement impliqués dans la synthèse d'un nouveau métabolite secondaire mais il a un inconvénient : il donne un grand nombre de faux positifs. Mais il reste un outil très utile pour l'identification d'un nouveau cluster de gènes de biosynthèse. Le classement des ilots obtenu a permis de donner un ordre aux différents ilots ce qui permet de commencer l'étude avec les ilots les plus prometteurs.

La technologie CRISPR se base sur un système de défense bactérien contre les ADN exogènes (Horvath and Barrangou, 2010). Elle exploite la capacité de Cas9 et des petits ARNsg pour développer un système de modification de l'ADN. Ce système peut permettre la délétion, l'insertion ou le remplacement d'un gène, elle peut permettre également de modifier l'expression d'un gène, d'entraîner des modifications de l'ADN en un point précis et même de localiser certains loci (site 9). Cette technologie a d'abord été utilisée sur les eucaryotes (Jiang *et al.*, 2013), puis sur les procaryotes et notamment les actinomycètes (Cobb *et al.*, 2015). Cette technologie a récemment été adaptée aux actinomycètes ce qui permet de déléter précisément un gène ou un groupe de gène en utilisant le système de réparation par recombinaison homologue des actinomycètes. Certains auteurs ont réussi, grâce à ce système, à déléter des cluster de gènes de biosynthèse entier, le plus grand étant celui codant la synthèse de l'antibiotique CDA (calcium dependant antibiotic) chez *S. coelicolor* qui fait 82,8 Kb (Huang *et al.*, 2015). Certains systèmes utilisent un seul ARNsg et donc ne génèrent qu'une cassure double brin dans l'ADN (Tong *et al.*, 2015, Huang *et al.*, 2015). D'autres utilisent deux ARNsg (Cobb *et al.*, 2015). La technologie utilisée dans ce stage est celle développée par Tong et ses collaborateurs, elle est apparue comme un bon outil pour l'étude des ilots génomiques car elle permet déjà de déléter des portions d'ADN plus grandes que la plupart des ilots étudiés dans ce stage en une seule coupure. Cette technologie a été utilisée pour déléter les ilots A6002 et A6007.

Malheureusement aucun des clones qui ont pu être isolés suite à l'utilisation de ce système ne semblait être délété pour les ilots génomiques ciblés. Il existe plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer cette absence de délétion : il y aurait pu y avoir un problème dans l'expression du gène *cas9* ou de la séquence codant les ARNsg chez les mutants ou la délétion obtenue est plus grande que prévue ce qui explique qu'il n'y ait pas d'amplification par PCR. Cependant la troisième hypothèse est moins probable car l'utilisation des fragments d'homologie permet d'utiliser le système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue ce qui doit permettre de conserver les régions flanquant l'ilot et donc permettre l'hybridation des amorces utilisées. Même si les auteurs

ont testé cette technologie en délétant des gènes uniques (Tong *et al.*, 2015), ils obtiennent 100 % de délétion. Une autre équipe utilise une technologie similaire qui permet l'excision de cluster de gènes de biosynthèse et ils annoncent également un taux de réussite de 100 % avec un seul ARNsg (Huang *et al.*, 2015). Une des solutions possibles serait d'utiliser des amorces qui seraient plus éloignées de l'ilot, d'autant plus que les auteurs utilisent ce type d'amorces. On pourrait également utiliser des amorces qui s'hybrident à l'intérieur de l'ilot pour vérifier s'il est toujours présent par PCR ou utiliser une sonde qui s'hybride au même endroit pour vérifier sa présence par Southern blot.

Une fois que le problème de vérification de la délétion des ilots sera réglé, ce système sera utilisé pour déléter tous les ilots restants un par un. Les mutants obtenus seront ensuite testés par test d'activité et par profilage HPLC.

3) Expression hétérologue d'ilots génomiques avec le système TAR

Le troisième objectif de mon travail était de réaliser une expression hétérologue des ilots A6002 et A6058 en utilisant le système TAR. Ce système se base sur la grande efficacité du système de recombinaison de la levure *S. cerevisiae* ce qui permet d'intégrer de grands fragments d'ADN, dans mon cas un ilot génomique, dans un vecteur de capture. Cette technique a déjà été utilisée pour l'intégration de clusters de gènes de biosynthèse comme celui de la taromycine A (Yamanaka *et al.*, 2014). Le système de contre-sélection qui utilise le 5-FOA et qui permet de ne sélectionner que les clones qui ont intégré l'ADN dans le plasmide, a été mis en place par Tang et ses collaborateurs (Tang *et al.*, 2015). Ce système a fortement augmenté la proportion de transformants positifs au sein des levures obtenues après transformation.

Lors de la transformation des sphéroplastes de *S. cerevisiae* par le vecteur pCAP03 contenant le fragment d'homologie de l'ilot 6002 linéarisé par *PmeI* et l'ADN de *S. ambofaciens* digéré par une enzyme de restriction ne coupant pas l'ilot, aucun clone ne s'est développé sur les boîtes. Il y a plusieurs hypothèses qui peuvent expliquer ce résultat négatif : l'ilot génomique n'a pas été intégré dans le plasmide ce qui a entraîné l'activation du système de contre-sélection et a tué les transformants. Une autre hypothèse serait que les sphéroplastes ont éclaté lors de la transformation, en effet ce sont des levures dont la paroi a été digérée par une enzyme (zymolyase) ce qui permet la transformation mais les rend très fragile (le simple fait d'ajouter du SDS dans la cuve du spectromètre lors de la mesure du DO fait éclater les sphéroplastes). La deuxième hypothèse peut être rejetée car lors de la transformation, des sphéroplastes issus de la même culture avaient été transformés avec

le vecteur puis inoculés sur une boîte sans 5-FOA, ces sphéroplastes se sont développés ce qui indique que le problème viendrait de la transformation et non pas de préparation des sphéroplastes.

La souche qui devait servir d'hôte est une souche de *S. coelicolor*, la souche M1154, qui est a été spécialement créée pour être un hôte (Gomez-Escribano and Bibb, 2014). En effet les auteurs ont enlevé les clusters de biosynthèse de l'actinorhodine, de la coelimycine, de la prodiginine et de l'antibiotique dépendant au calcium. De plus ils ont introduit des mutations dans les gènes *rpoB* (code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase) et *rpsL* (code une sous-unité de l'ARNr 30S), des mutations connues pour entraîner une augmentation de la production des différents antibiotiques sans impacter la croissance chez les *Streptomyces* (Shimaet *al.*, 1996; Okamoto-Hosoya *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002).

Lorsque l'équipe aura maîtrisé la technique et que l'on connaîtra l'ensemble des précautions à prendre pour réussir l'étape de transformation, l'ensemble des autres ilots seront alors clonés de la même manière dans le vecteur pCAP03. Les différents plasmides seront extraits puis transformés dans *E. coli* pour enfin être introduits dans *S. coelicolor* M1154. Ensuite il faudra cribler les différents exconjugants obtenus par des tests d'activité et par profilage HPLC.

Bibliographie

- Aigle, B., S. Lautru, D. Spiteller, J.S. Dickschat, G.L. Challis, P. Leblond, and J.P. Pernodet. "Genome Mining of *Streptomyces Ambofaciens*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, no. 2 (February 2014) : 251–63. doi :10.1007/s10295-013-1379-y.
- Angert, E. "Alternatives to Binary Fission in Bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 3, no. 3 (March 2005) : 214–24. doi :10.1038/nrmicro1096.
- Baltz, R. "Antimicrobials from Actinomycetes : Back to the Future." *American Society for Microbiology, Microbe*, 2, no. 3 (2007) : 125–31.
- Baltz, R. "Renaissance in Antibacterial Discovery from Actinomycetes." *Current Opinion in Pharmacology* 8, no. 5 (October 2008) : 557–63. doi :10.1016/j.coph.2008.04.008.
- Barke, J., R.F. Seipke, S. Grünschow, D. Heavens, N. Drou, M.J. Bibb, R.J.M. Goss, D.W. Yu, and M.I. Hutchings. "A Mixed Community of Actinomycetes Produce Multiple Antibiotics for the Fungus Farming Ant *Acromyrmex Octospinosus*." *BMC Biology* 8, no. 1 (2010) : 109. doi :10.1186/1741-7007-8-109.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A.-M. Cerdeño-Tárraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, et al. "Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *Nature* 417, no. 6885 (May 9, 2002) : 141–47. doi :10.1038/417141a.
- Bertani, G. "Studies on Lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 62, no. 3 (September 1951) : 293–300.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schoner. "Plasmid Cloning Vectors for the Conjugal Transfer of DNA from *Escherichia Coli* to *Streptomyces* Spp." *Gene* 116, no. 1 (July 1, 1992) : 43–49.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7, no. 6 (November 24, 1979) : 1513–23.
- Bode, H.B., B. Bethe, R. Höfs, and A. Zeeck. "Big Effects from Small Changes : Possible Ways to Explore

- Nature's Chemical Diversity." *ChemBioChem* 3, no. 7 (July 3, 2002) : 619. doi :10.1002/1439-7633(20020703)3 :7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9.
- Boucher, H.W., G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett. "Bad Bugs, No Drugs : No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 48, no. 1 (January 2009) : 1–12. doi :10.1086/595011.
- Bunet, R., R. Riclea, L. Laureti, L. Hôtel, C. Paris, J.M. Girardet, D. Spiteller, J.S. Dickschat, P. Leblond, and B. Aigle. "A Single Sfp-Type Phosphopantetheinyl Transferase Plays a Major Role in the Biosynthesis of PKS and NRPS Derived Metabolites in *Streptomyces Ambofaciens* ATCC23877." Edited by P. Hoskisson. *PLoS ONE* 9, no. 1 (January 31, 2014) : e87607. doi :10.1371/journal.pone.0087607.
- Chu, G., Vollrath, D. & Davis, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582–1585 (1986).
- Claessen, D., W. de Jong, L. Dijkhuizen, and H.A.B. Wösten. "Regulation of *Streptomyces* Development : Reach for the Sky!" *Trends in Microbiology* 14, no. 7 (July 2006) : 313–19. doi :10.1016/j.tim.2006.05.008.
- Clardy, J., M.A. Fischbach, and C.R. Currie. "The Natural History of Antibiotics." *Current Biology* 19, no. 11 (June 2009) : R437–41. doi :10.1016/j.cub.2009.04.001.
- Cobb, R. E., Y. Wang, and H. Zhao. "High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System." *ACS Synthetic Biology* 4, no. 6 (June 19, 2015) : 723–28. doi :10.1021/sb500351f.
- Cosar, C., L. Ninet, S. Pinnert-Sindico, and J. Preud'homme. "[Trypanocide action of an antibiotic produced by a *Streptomyces*]." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences* 234, no. 14 (March 31, 1952) : 1498–99.
- Gaillard, M., T. Vallaey, F. J. Vorholter, M. Minoia, C. Werlen, V. Sentchilo, A. Puhler, and J. R. van der Meer. "The Clc Element of *Pseudomonas* Sp. Strain B13, a Genomic Island with Various Catabolic Properties." *Journal of Bacteriology* 188, no. 5 (March 1, 2006) : 1999–2013. doi :10.1128/JB.188.5.1999-2013.2006.
- Giske, C. G., D. L. Monnet, O. Cars, Y. Carmeli, and on behalf of ReAct-Action on Antibiotic Resistance. "Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, no. 3 (March 1, 2008) : 813–21. doi :10.1128/AAC.01169-07.
- Gomez-Escribano, J.P., and M. J. Bibb. "Heterologous Expression of Natural Product Biosynthetic Gene Clusters in *Streptomyces Coelicolor* : From Genome Mining to Manipulation of Biosynthetic Pathways." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, no. 2 (February 2014) : 425–31. doi :10.1007/s10295-013-1348-5.
- Granozzi, C., R. Billetta, R. Passantino, M. Sollazzo, and A. M. Puglia. "A Breakdown in Macromolecular Synthesis Preceding Differentiation in *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *Journal of General Microbiology* 136, no. 4 (April 1990) : 713–16. doi :10.1099/00221287-136-4-713.
- Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel. "Deletions of Chromosomal Regions Coding for Fimbriae and Hemolysins Occur in Vitro and in Vivo in Various Extraintestinal *Escherichia Coli* Isolates." *Microbial Pathogenesis* 8, no. 3 (March 1990) : 213–25.
- Hanahan, D. "Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166, no. 4 (June 5, 1983) : 557–80.
- Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C.J. Gardner, J.A. Cullum, and S.G. Oliver. "Dispersed Growth of *Streptomyces* in Liquid Culture." *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, no. 3 (1989) : 272–77. doi :10.1007/BF00258408.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. "A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids."

- Analytical Biochemistry* 114, no. 1 (June 1981) : 193–97.
- Hopwood, D. A. “Genetic Analysis and Genome Structure in *Streptomyces Coelicolor*.” *Bacteriological Reviews* 31, no. 4 (December 1967) : 373–403.
- Horvath, P., and R. Barrangou. “CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea.” *Science* 327, no. 5962 (January 8, 2010) : 167–70. doi :10.1126/science.1179555.
- Hu, H., Q. Zhang, and K. Ochi. “Activation of Antibiotic Biosynthesis by Specified Mutations in the *rpoB* Gene (Encoding the RNA Polymerase Beta Subunit) of *Streptomyces Lividans*.” *Journal of Bacteriology* 184, no. 14 (July 2002) : 3984–91.
- Huang, H., G. Zheng, W. Jiang, H. Hu, and Y. Lu. “One-Step High-Efficiency CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *Streptomyces*.” *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 47, no. 4 (April 2015) : 231–43. doi :10.1093/abbs/gmv007.
- Jiang, W., H. Zhou, H. Bi, M. Fromm, B. Yang, and D. P. Weeks. “Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-Mediated Targeted Gene Modification in Arabidopsis, Tobacco, Sorghum and Rice.” *Nucleic Acids Research* 41, no. 20 (November 1, 2013) : e188–e188. doi :10.1093/nar/gkt780.
- Juhas, M., J.R. van der Meer, M. Gaillard, R.M. Harding, D.W. Hood, and D.W. Crook. “Genomic Islands : Tools of Bacterial Horizontal Gene Transfer and Evolution.” *FEMS Microbiology Reviews* 33, no. 2 (March 2009) : 376–93. doi :10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- Kieser, T., ed. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich : Innes, 2000.
- Kim, U. J., B. W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H. L. Kang, M. I. Simon, and H. Shizuya. “Construction and Characterization of a Human Bacterial Artificial Chromosome Library.” *Genomics* 34, no. 2 (June 1, 1996) : 213–18. doi :10.1006/geno.1996.0268.
- Larbig, K. D., A. Christmann, A. Johann, J. Klockgether, T. Hartsch, R. Merkl, L. Wiehlmann, H.-J. Fritz, and B. Tummeler. “Gene Islands Integrated into tRNAGly Genes Confer Genome Diversity on a *Pseudomonas Aeruginosa* Clone.” *Journal of Bacteriology* 184, no. 23 (December 1, 2002) : 6665–80. doi :10.1128/JB.184.23.6665-6680.2002.
- Laureti, L., L. Song, S. Huang, C. Corre, P. Leblond, G. L. Challis, and B. Aigle. “Identification of a Bioactive 51-Membered Macrolide Complex by Activation of a Silent Polyketide Synthase in *Streptomyces Ambofaciens*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 15 (April 12, 2011) : 6258–63. doi :10.1073/pnas.1019077108.
- Leblond, P., and B. Decaris. “New Insights into the Genetic Instability of *Streptomyces*.” *FEMS Microbiology Letters* 123, no. 3 (November 1, 1994) : 225–32.
- Leblond, P., F.X. Francou, J-M. Simonet, and B. Decaris. “Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of the Genome of *Streptomyces Ambofaciens* Strains.” *FEMS Microbiology Letters* 72, no. 1–2 (October 1990) : 79–88. doi :10.1111/j.1574-6968.1990.tb03866.x.
- Lewis, K. “Platforms for Antibiotic Discovery.” *Nature Reviews Drug Discovery* 12, no. 5 (April 30, 2013) : 371–87. doi :10.1038/nrd3975.
- Liao, R., L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, and W. Liu. “Thiopeptide Biosynthesis Featuring Ribosomally Synthesized Precursor Peptides and Conserved Posttranslational Modifications.” *Chemistry & Biology* 16, no. 2 (February 2009) : 141–47. doi :10.1016/j.chembiol.2009.01.007.
- Ling, L.L., T. Schneider, A.J. Peoples, A.L. Spoering, I. Engels, B.P. Conlon, A. Mueller, et al. “A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance.” *Nature* 517, no. 7535 (January 7, 2015) : 455–59. doi :10.1038/nature14098.
- Murakami, T., T. G. Holt, and C. J. Thompson. “Thiostrepton-Induced Gene Expression in *Streptomyces Lividans*.” *Journal of Bacteriology* 171, no. 3 (March 1989) : 1459–66.
- Nett, M., Haruo Ikeda, and Bradley S. Moore. “Genomic Basis for Natural Product Biosynthetic Diversity in the Actinomycetes.” *Natural Product Reports* 26, no. 11 (2009) : 1362. doi :10.1039/b817069j.

- Newman, D.J., and G.M. Cragg. "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *Journal of Natural Products* 75, no. 3 (March 23, 2012) : 311–35. doi :10.1021/np200906s.
- Ohnishi, Y., J. Ishikawa, H. Hara, H. Suzuki, M. Ikenoya, H. Ikeda, A. Yamashita, M. Hattori, and S. Horinouchi. "Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces Griseus* IFO 13350." *Journal of Bacteriology* 190, no. 11 (June 1, 2008) : 4050–60. doi :10.1128/JB.00204-08.
- Okamoto-Hosoya, Y., T. A. Sato, and K. Ochi. "Resistance to Paromomycin Is Conferred by rpsL Mutations, Accompanied by an Enhanced Antibiotic Production in *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *The Journal of Antibiotics* 53, no. 12 (December 2000) : 1424–27.
- Paget, M. S., L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, and M. J. Buttner. "Evidence That the Extracytoplasmic Function Sigma Factor sigmaE Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *Journal of Bacteriology* 181, no. 1 (January 1999) : 204–11.
- Pandza, K., G. Pfalzer, J. Cullum, and D. Hranueli. "Physical Mapping Shows That the Unstable Oxytetracycline Gene Cluster of *Streptomyces Rimosus* Lies close to One End of the Linear Chromosome." *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 5) (May 1997) : 1493–1501. doi :10.1099/00221287-143-5-1493.
- Pandza, S., G. Biuković, A. Paravić, A. Dadbin, J. Cullum, and D. Hranueli. "Recombination between the Linear Plasmid pPZG101 and the Linear Chromosome of *Streptomyces Rimosus* Can Lead to Exchange of Ends." *Molecular Microbiology* 28, no. 6 (June 1998) : 1165–76.
- Pang, X., B. Aigle, J.M. Girardet, S. Mangenot, J.L. Pernodet, B. Decaris, and P. Leblond. "Functional Angucycline-like Antibiotic Gene Cluster in the Terminal Inverted Repeats of the *Streptomyces Ambofaciens* Linear Chromosome." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, no. 2 (February 2004) : 575–88.
- Pinnert-Sindico, S. "[A new species of *Streptomyces* producing antibiotics *Streptomyces ambofaciens* n. sp., cultural characteristics]." *Annales De l'Institut Pasteur* 87, no. 6 (December 1954) : 702–7.
- Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A.W. Thomae, D.A. Hopwood, and G.P. van Wezel. "Feast or Famine : The Global Regulator DasR Links Nutrient Stress to Antibiotic Production by *Streptomyces*." *EMBO Reports* 9, no. 7 (July 2008) : 670–75. doi :10.1038/embor.2008.83.
- Sánchez-Hidalgo, M., J. Pascual, M. de la Cruz, J. Martín, G.S. Kath, J.M. Sigmund, P. Masarekar, F. Vicente, O. Genilloud, and G.F. Bills. "Prescreening Bacterial Colonies for Bioactive Molecules with Janus Plates, a SBS Standard Double-Faced Microbial Culturing System." *Antonie van Leeuwenhoek* 102, no. 2 (August 2012) : 361–74. doi :10.1007/s10482-012-9746-7.
- Schatz, A., E. Bugle, and S. A. Waksman. "Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*." *Experimental Biology and Medicine* 55, no. 1 (January 1, 1944) : 66–69. doi :10.3181/00379727-55-14461.
- Schoenian, I., C. Paetz, J.S. Dickschat, B. Aigle, P. Leblond, and D. Spiteller. "An Unprecedented 1,2-Shift in the Biosynthesis of the 3-Aminosalicylate Moiety of Antimycins." *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* 13, no. 6 (April 16, 2012) : 769–73. doi :10.1002/cbic.201200033.
- Schrey, S.D., E. Erkenbrack, E. Früh, S. Fengler, K. Hommel, N. Horlacher, D. Schulz, et al. "Production of Fungal and Bacterial Growth Modulating Secondary Metabolites Is Widespread among Mycorrhiza-Associated Streptomyces." *BMC Microbiology* 12, no. 1 (2012) : 164. doi :10.1186/1471-2180-12-164.
- Seipke, R.F., J. Barke, C. Brearley, L. Hill, D.W. Yu, R.J.M. Goss, and M.I. Hutchings. "A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant Acromyrmex Octospinosus." Edited by J.H. Yu. *PLoS ONE* 6, no. 8 (August 3, 2011) : e22028. doi :10.1371/journal.pone.0022028.

- Selvakumar, J.N., S.D. Chandrasekaran, and M. Vaithilingam. "Bio Prospecting of Marine-Derived *Streptomyces Spectabilis* VITJS10 and Exploring Its Cytotoxicity against Human Liver Cancer Cell Lines." *Pharmacognosy Magazine* 11, no. 44 (2015) : 469. doi :10.4103/0973-1296.168974.
- Sherman, F. "Getting Started with Yeast." *Methods in Enzymology* 194 (1991) : 3–21.
- Shima, J., A. Hesketh, S. Okamoto, S. Kawamoto, and K. Ochi. "Induction of Actinorhodin Production by rpsL (Encoding Ribosomal Protein S12) Mutations That Confer Streptomycin Resistance in *Streptomyces Lividans* and *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *Journal of Bacteriology* 178, no. 24 (December 1996) : 7276–84.
- Smith, T.M., Y.F. Jiang, P. Shipley, and H.G. Floss. "The Thiostrepton-Resistance-Encoding Gene in *Streptomyces Laurentii* Is Located within a Cluster of Ribosomal Protein Operons." *Gene* 164, no. 1 (October 1995) : 137–42. doi :10.1016/0378-1119(95)00442-9.
- Swiatek, M. A., E. Tenconi, S. Rigali, and G. P. van Wezel. "Functional Analysis of the N-Acetylglucosamine Metabolic Genes of *Streptomyces Coelicolor* and Role in Control of Development and Antibiotic Production." *Journal of Bacteriology* 194, no. 5 (March 1, 2012) : 1136–44. doi :10.1128/JB.06370-11.
- Tang, X., J. Li, N. Millán-Aguiñaga, J.J. Zhang, E.C. O'Neill, J.A. Ugalde, P.R. Jensen, S.M. Mantovani, and B.S. Moore. "Identification of Thiotetronic Acid Antibiotic Biosynthetic Pathways by Target-Directed Genome Mining." *ACS Chemical Biology* 10, no. 12 (December 18, 2015) : 2841–49. doi :10.1021/acscchembio.5b00658.
- Thibessard, A., D. Haas, C. Gerbaud, B. Aigle, S. Lautru, J.L. Pernodet, and P. Leblond. "Complete Genome Sequence of *Streptomyces Ambofaciens* ATCC 23877, the Spiramycin Producer." *Journal of Biotechnology* 214 (November 20, 2015) : 117–18. doi :10.1016/j.jbiotec.2015.09.020.
- Tong, Y., P. Charusanti, L. Zhang, T. Weber, and S.Y. Lee. "CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes." *ACS Synthetic Biology* 4, no. 9 (September 18, 2015) : 1020–29. doi :10.1021/acssynbio.5b00038.
- Weber, T., K. Blin, S. Duddela, D. Krug, H.U. Kim, R. Bruccoleri, S.Y. Lee, et al. "antiSMASH 3.0—a Comprehensive Resource for the Genome Mining of Biosynthetic Gene Clusters." *Nucleic Acids Research* 43, no. W1 (July 1, 2015) : W237–43. doi :10.1093/nar/gkv437.
- Wickerham, L. J., and K. A. Burton. "Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeasts." *Journal of Bacteriology* 56, no. 3 (September 1948) : 363–71.
- Yamanaka, K., K.A. Reynolds, R.D. Kersten, K.S. Ryan, D.J. Gonzalez, V. Nizet, P.C. Dorrestein, and B.S. Moore. "Direct Cloning and Refactoring of a Silent Lipopeptide Biosynthetic Gene Cluster Yields the Antibiotic Taromycin A." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, no. 5 (February 4, 2014) : 1957–62. doi :10.1073/pnas.1319584111.

Sitographie

- 1 : <http://ecdc.europa.eu/>
- 2 : http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/waksman-lecture.pdf
- 3 : https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/advanced-medicineprize2015.pdf
- 4 : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 5 : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18012039>
- 6 : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502>

7 : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>

8 : <http://antismash.secondarymetabolites.org/>

9 : <http://www.nature.com/nbt/journal/v32/n4/images/nbt.2842-F2.jpg>

Annexe 1 : Amorces

Tableau 6 Séquence et utilisation des différentes amorces utilisées lors de ce stage

Nom	Séquence	Utilisation
cL-AA6007 fw	TCGTCGAAGGCACTAGAAAGGGTAGAAGATGCTGGAGCGCC	Amplification bras d'homologie gauche ilot A6007
cL-AA6007 rev	CTCGTCGAGGGACTCCTGCCGCACCTCGCTCAACAAGCAG	
cR-AA6007 fw	CGGCAGGAGTCCCTCGACGAG	Amplification bras d'homologie droit ilot A6007
cR-AA6007 rev	GGTCGATCCCCGCATATAGGCTACCGCTGGTTCACCGAT	
cL-AA6002 fw	TCGTCGAAGGCACTAGAAAGGGCTCTATCCGCCTCCATGC	Amplification bras d'homologie gauche ilot A6002
cL-AA6002 rev	CTCATTGGAAGGTGGTCTCGCCGAACTTCCATGAACCG	
cR-AA6002 fw	CGAGACCACCTTCCAATGAG	Amplification bras d'homologie droit ilot A6002
cR-AA6002 rev	GGTCGATCCCCGCATATAGGGATGCGTCCTTCGGTGAGCT	
CRISPR.seq fw	GCTTGATAACCGATAGTTGCG	Vérification de la présence des bras d'homologies dans le vecteur pCRISPR Cas9 + séquençage
CRISPR.seq rev	CTGCTGTGTTTCAGTGACG	
ARNsgA600702fw	CATGCCATGGCATAACGGAACAGACTCACCAGTTTTAGAGC TAGAAATAGC	Amplification ARNsgA600702
ARNsgA600707fw	CATGCCATGGGCGCGCTTCCGCCGACTGCTGTTTTAGAGCT AGAAATAGC	Amplification ARNsgA600707
ARNsgA600722fw	CATGCCATGGGGCATGATCTGAGAGCATCTGTTTTAGAGCT AGAAATAGC	Amplification ARNsgA600722
ARNsgA600203fw	CATGCCATGGTTCGGGCACGTGGCGGGGTAGTTTTAGAGC TAGAAATAGC	Amplification ARNsgA600203

ARNsgA600215fw	CATGCCATGGCTCCTCCAGGCCCGCCCACGGTTTTAGAGCT AGAAATAGC	Amplification ARNsgA600215
ARNsgA600222fw	CATGCCATGGGACACCGTCGTTACGGCGTGTTTTAGAGCT AGAAATAGC	Amplification ARNsgA600222
ARNsg rev	ACGCCTACGTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC	Amplification de tous les ARNsg
seq-ARNsg fw	ACATGTGCGGTTCGATCTT	Séquençage de tous les ARNsg
seq-ARNsg rev	TACGTAAAAAAGCACCGAC	
tL-A6058 fw	CATGGTATAAATAGTGGCCAGCAGTTCCTCCATCCTTGC	Amplification bras d'homologie gauche ilot 6058
tL-A6058 rev	GACACTTCCCTTACGACCGCGTTTAAACGTGACGCATTCTT GGCGG	
tR-A6058 fw	GCGGTCGTAAGGGAAGTGTC	Amplification bras d'homologie droit ilot 6058
tR-A6058 rev	TATGTAGCTTTCGACATACGACGAGAGCCACGAGCG	
pCAP Seq fw	AATCATTCCATCCACTTC	Séquençage des bras d'homologie insérés dans le vecteur pCAP03
pCAP Seq rev	TGCTTCAACTAACTCCAG	
Vérif L376 amont	TGCCTCGTCCTCGTCCTCTCGGGGTT	Vérification présence de la cassette/du SCAR à la place du gène <i>samL376</i> (<i>sam0428</i>) lors de la création du mutant OSC6bis.
Vérif L376 aval	GCCACGTGAGGGTTGTGCT	
Vérif 376 F	CGCCTGGACGACGAGGAGGT	
Vérif 376 R	CAGATGGACGCGCAGGTCGG	
PSM8.2	GTGAGTGTCTAACTGCGTGACA	

Annexe 2 : Cartes des différents plasmides utilisés

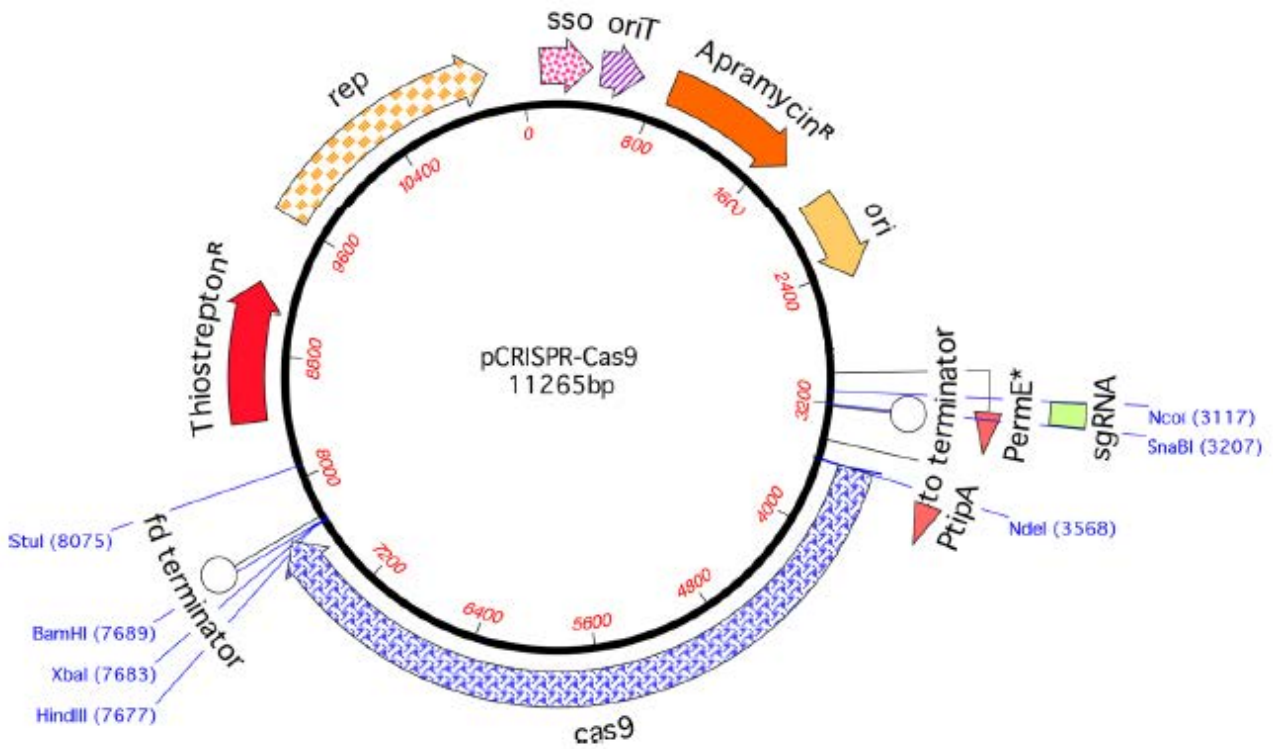


Figure 18 : Carte du plasmide pCRISPR-Cas9 (d'après Tong et al., 2015)

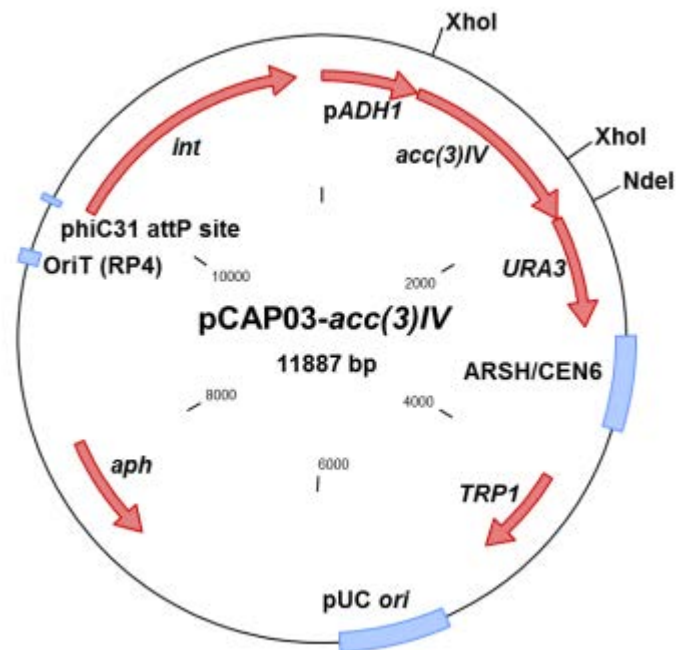


Figure 19 : Carte du plasmide pCAP03 (d'après Tang et al., 2015)

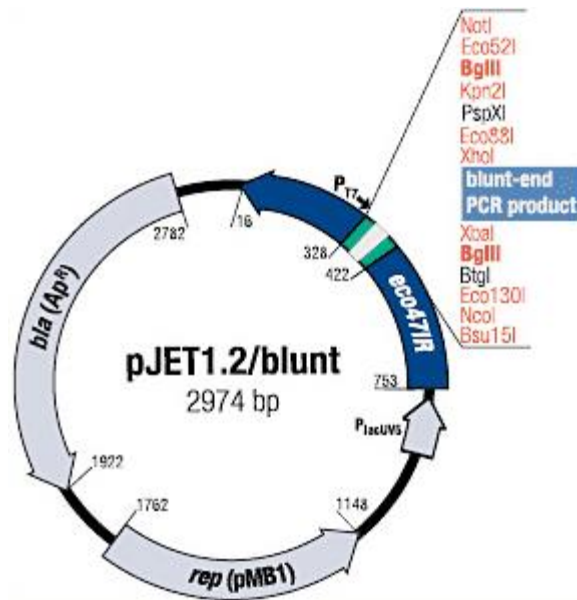


Figure 20 : Carte du plasmide pJET 1.2/blunt (site 6)

Annexe 3 : Copie de la convention de stage

ANNEXE



Année universitaire : 2015/2016

Convention de stage entre

Note : pour faciliter la lecture du document, les mots « stagiaire », « enseignant référent », « tuteur de stage », « représentant légal », « étudiant » sont utilisés au masculin

<p>1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT OU DE FORMATION</p> <p>Nom : Université de Lorraine Adresse : 34 Cours Léopold – CS 25233 – 54052 NANCY Cédex , Siret n°130 015 506 00012, représenté par son Président, Monsieur Pierre Mutzenhardt Représenté par (signataire de la convention) : Monsieur Stéphane FLAMENT Qualité du représentant : Doyen de l'UFR Faculté des Sciences et Technologies Composante/UFR ... : Faculté des Sciences et Technologies mél : Stephane.Flament@univ-lorraine.fr Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Master BioMANE – Secteur Biologie – Campus Aiguillettes – BP 70239 – 54506 Vandoeuvre les Nancy cédex</p>	<p>2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL</p> <p>Nom : UMR A 1128 – Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne Adresse : Campus Aiguillettes – BP 70239 – 54506 Vandoeuvre les Nancy cédex Représenté par (nom du signataire de la convention) : Monsieur Bertrand Aigle Qualité du représentant : Service dans lequel le stage sera effectué : mél : Lieu de stage (si différent de l'adresse de l'organisme) :</p>
--	--

3 - LE STAGIAIRE

Nom : Houin Prénom : Anthony
 Sexe : F M Né(e) le : 15/03/1991
 Adresse : 3 Rue Colmar 54700 Pont-à-Mousson
 mél : anthony.houin9@etu.univ-lorraine.fr
 INTITULE DE LA FORMATION OU DU CURSUS SUIVI DANS L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : MASTER BIOTECHNOLOGIES
 MICROBIOLOGIES ALIMENT NUTRITION ENVIRONNEMENT (BIOMANE)

SUJET DE STAGE *Recherche de nouveaux métabolites secondaires chez *Shewanella* par une approche originale de génomique comparative et caractérisation fonctionnelle de ces clusters.*

Dates : Du 18 Janvier 2016 au 15 Juillet 2016
 Représentant une durée totale de 6 (Nombre de Semaines / de Mois (rayer la mention inutile)
 Et correspondant à135..... Jours de présence effective dans l'organisme d'accueil.
 Répartition si présence discontinue : nombre d'heures par semaine ou nombre d'heures par jour (rayer la mention inutile).
 Commentaire :

<p>ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT</p> <p>Nom et prénom de l'enseignant référent : LEBLOND-BOURGET Nathalie Fonction (ou discipline) : Directeur du Master BioMANE 03 83 68 42 10 mél : nathalie.leblond@univ-lorraine.fr</p>	<p>ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ORGANISME D'ACCUEIL</p> <p>Nom et prénom du tuteur de stage : Bertrand Aigle Fonction : mél : bertrand.aigle@univ-lorraine.fr</p>
--	--

Caisse primaire d'assurance maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile du stagiaire sauf exception) :

Article 1 – Objet de la convention

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

Article 2 – Objectif du stage

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant(e) acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.

ACTIVITES CONFIEES :

.....

COMPETENCES A ACQUERIR OU A DEVELOPPER :

.....

Article 3 – Modalités du stage

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de heures sur la base d'un temps complet/ temps partiel (rayer la mention inutile),

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers :

Article 4 – Accueil et encadrement du stagiaire

Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages. Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.

Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement.

L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer.

Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITES D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc)

.....

Article 5 – Gratification - Avantages

En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L.4381-1 du code de la santé publique.

Le montant horaire de la gratification est fixé à 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.

La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.

La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.

L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

(article 5 suite) En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du/de la stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à €
par heure / jour / mois (rayer les mentions inutiles)

Article 5 bis – Accès aux droits des salariés – Avantages (Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.

Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.

AUTRES AVANTAGES ACCORDES :

Article 5ter – Accès aux droits des agents - Avantages (Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre leur domicile et leur lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.

Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.

Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

AUTRES AVANTAGES ACCORDES :

Article 6 – Régime de protection sociale

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur.

Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.

Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

6-1 Gratification d'un montant maximum de 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale :

La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2° de l'article L.418-2, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

gratification supérieure à 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale :

Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 13,75 % du plafond horaire de la Sécurité Sociale.

L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

6.3 – Protection Maladie du/de la stagiaire à l'étranger

1) Protection issue du régime étudiant français

- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).

- pour les stages effectués au Québec par les étudiant(e)s de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en université) ;

- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants peuvent exister entre les frais engagés et les tarifs français base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance Maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu du droit local (voir 2° ci-dessous).

2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil

En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :

OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français

NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant).

Si aucune case n'est cochée, le 6.3 – 1 s'applique.

6.4 Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger

1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :

- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;
- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;
- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.

Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.

2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.

3) La couverture concerne les accidents survenus :

- dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
- sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
- dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire et obligatoirement par ordre de mission,

(6-4 suite)

• lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),

• lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.

4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1/ n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le/la stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.

5) Dans tous les cas :

• si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;

• si l'étudiant remplit des missions limitées en-dehors de l'organisme d'accueil ou en-dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

Article 7 – Responsabilité et assurance

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garants au titre de la responsabilité civile.

Pour les stages à l'étranger ou outremer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant

Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitter de la prime y afférente.

Article 8 – Discipline

Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.

Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

Article 9 – Congés – Interruption du stage

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code de travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.

NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :

.....
Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.

Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

(le 9 suite)
 En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

Article 10 – Devoir de réserve et confidentialité

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues par eux pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 – Propriété intellectuelle

Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.

Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Article 12 – Fin de stage – Rapport - Evaluation

1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale ;

2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage.

Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

3) Evaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent (ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent).....

4) Modalités d'évaluation pédagogiques : le stagiaire devra (préciser la nature du travail à fournir – rapport, etc. – éventuellement en joignant une annexe).....

NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) :

5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

Article 13 – Droit applicable – Tribunaux compétents

La présente convention est régie exclusivement par le droit français. Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

FAIT A Vandœuvre LE 07/10/2016

POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT

Nom et signature du représentant de l'établissement

FLAMENT Stéphane DOMENJOD

Doyen de l'UFR EST,

Faculté des Sciences et Technologies
 Le Doyen,
 S. FLAMENT
 Le Vice-Doyen
 Le Doyen
 S. FLAMENT

STAGIAIRE (ET SON REPRESENTANT LEGAL, LE CAS

ECHÉANT) HOVIN Anthony

L'enseignant référent du stagiaire

LEBLOND-BOURGET Nathalie
 Directeur des Etudes

N Leblond

POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL

Nom et signature du représentant de l'organisme d'accueil

Pierre LEBLOND
 Professeur

Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil

Nom et signature

D. Ayle
D. Ayle

Fiches à annexer à la convention :

- ① Attestation de stage (page suivante)
- ② Fiche stage à l'étranger (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr, pour fiches pays voir site diplomatie.gouv.fr)
- ③ Autres annexes (le cas échéant)

Résumé :

Les métabolites secondaires (MS) sont utilisés depuis très longtemps dans des différents domaines comme la médecine humaine et vétérinaire (antibiotique, anti tumoral) ou l'agriculture (antifongique). *Streptomyces ambofaciens*, la bactérie modèle de l'équipe StrAda, produit de nombreux métabolites secondaires dont cinq molécules antimicrobiennes. Une souche mutante incapable de produire les antibiotiques spiramycine, congocidine et kinamycine a été mutée indépendamment dans chacun des autres clusters de gènes de biosynthèse de MS identifiés suite au séquençage du génome de *S. ambofaciens*. Malgré ces mutations, une activité antibactérienne persiste chez toutes les souches. Ceci indique qu'un nouveau type de cluster de gènes de biosynthèse non détectable par homologie de séquence pourrait être responsable de cette activité. Les gènes de biosynthèse pourraient être localisés dans un îlot génomique (IG), les clusters de biosynthèse de MS étant souvent retrouvés dans ces îlots. Le but de mon stage est de vérifier cette hypothèse par deux approches : la délétion d'IG en utilisant le système CRISPR, et l'expression hétérologue d'IG, via l'utilisation du système TAR, chez une souche de *Streptomyces* dédiée à la production de MS.

Mots clés : *Streptomyces ambofaciens*, îlot génomique, métabolites secondaires, délétion, expression hétérologue

Abstract :

Secondary metabolites (SM) are used since a long time in different domains like human and veterinary medicine (antibiotic, antitumor) or agriculture (anti-fungal). *Streptomyces ambofaciens*, StrAda team's model strain, produces a large number of secondary metabolites including five antimicrobial molecules. A mutant strain unable to produce the spiramycin, congocidine, and kinamycin antibiotics was mutated independently in each of the other SM biosynthetic gene clusters identified by the sequencing of the *S. ambofaciens* genome. Despite these mutations, an antibacterial activity remains. That indicates that a new kind of biosynthetic genes cluster which cannot be detected by homology based approaches is responsible of this activity. The biosynthetic genes could be located in a genomic island (GI), the SM biosynthetic genes clusters being often found in GIs. The aim of my internship is to test this hypothesis by two approaches: the GI's deletion by using the CRISPR system, and the GI's heterologous expression, by using the TAR system, in a *Streptomyces* strain dedicated to SM production.

Key words: *Streptomyces ambofaciens*, genomic island, secondary metabolites, deletion, heterologous expression