Recherche du déterminisme moléculaire d'un mutant PIG-PAP issu de l'instabilité génétique par complémentation fonctionnelle chez Streptomyces ambofaciens ATCC23877

Sibel Catakli

▶ **To cite this version:**

Sibel Catakli. Recherche du déterminisme moléculaire d'un mutant PIG-PAP issu de l'instabilité génétique par complémentation fonctionnelle chez Streptomyces ambofaciens ATCC23877. Microbiologie et Parasitologie. 2000. hal-01897542

HAL Id: hal-01897542

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01897542

Submitted on 17 Oct 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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-theses-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

SC N2000 136

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Parc du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

UNIVERSITE HENRI POINCARE, Nancy 1

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE MICROBIOLOGIE, ENZYMOLOGIE, NUTRITION

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES

SESSION JUILLET 2000

RECHERCHE DU DETERMINISME MOLECULAIRE D'UN MUTANT PIG^{-}PAP ISSU DE L'INSTABILITE GENETIQUE PAR COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE CHEZ *STREPTOMYCES AMBOFACIENS* ATCC23877

Mémoire présenté le 17 juillet 2000
par
Sibel CATAKLI

STAGE EFFECTUE AU LABORATOIRE DE GENETIQUE ET MICROBIOLOGIE
Unité associée INRA 952

Travaux dirigés par :
Dr. A. Dary et Pr. B. Decaris

Président du jury : Monsieur le Professeur Guy BRANLANT
Membres du jury : Madame le Docteur Christiane BRANLANT (Rapporteur)
Monsieur le Professeur Michel DAUCA
Monsieur le Professeur Bernard DECARIS
Monsieur le Professeur Jean-Luc GAILLARD
Monsieur le Professeur Luc MEJEAN
Monsieur le Professeur Jean-Pierre NICOLAS
Monsieur le Professeur Henri PETITDEMANGE
Monsieur le Professeur Bernard VITOUX

53204

SC N2000 136

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

UNIVERSITE HENRI POINCARE, Nancy 1

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE MICROBIOLOGIE, ENZYMOLOGIE, NUTRITION

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES

SESSION JUILLET 2000

RECHERCHE DU DETERMINISME MOLECULAIRE D'UN MUTANT PIG^{-}PAP ISSU DE L'INSTABILITE GENETIQUE PAR COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE CHEZ *STREPTOMYCES AMBOFACIENS* ATCC23877

Mémoire présenté le 17 juillet 2000
par
Sibel CATAKLI

STAGE EFFECTUE AU LABORATOIRE DE GENETIQUE ET MICROBIOLOGIE
Unité associée INRA 952

Travaux dirigés par :
Dr. A. Dary et Pr. B. Decaris

Président du jury :	Monsieur le Professeur Guy BRANLANT
Membres du jury :	Madame le Docteur Christiane BRANLANT (Rapporteur)
	Monsieur le Professeur Michel DAUCA
	Monsieur le Professeur Bernard DECARIS
	Monsieur le Professeur Jean-Luc GAILLARD
	Monsieur le Professeur Luc MEJEAN
	Monsieur le Professeur Jean-Pierre NICOLAS
	Monsieur le Professeur Henri PETITDEMANGE
	Monsieur le Professeur Bernard VITOUX

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

I. Notion de gènes mutables et d'états mutateurs 1

II. Les mécanismes impliqués dans la mutabilité des gènes de contingence chez les bactéries 2

A. La transposition 2

B. Le transfert horizontal 3

C. La recombinaison homologue 3

D. La recombinaison site-spécifique 4

E. La recombinaison illégitime 4

1.Le contrôle transcriptionnel 4

2. Le contrôle traductionnel 5

F. L'épimutation 5

1. La méthylation site-spécifique 5

2. La modification de la conformation de l'ADN 6

G. Modulation de la fréquence des mutations ponctuelles et des délétions 6

III. Les gènes mutables chez les bactéries du genre *Streptomyces* 6

A. La différenciation de *Streptomyces* 7

1. La différenciation morphologique 7

B. La différenciation physiologique 8

IV. Les gènes mutables chez *Streptomyces ambofaciens* 8

A. La pigmentation des colonies est un caractère mutable 8

B. Modulation de l'instabilité génétique et génomique via l'établissement d'un état mutateur 9

IV. Objectif du travail 10

MATERIELS ET METHODES 11

I. Souches bactériennes et plasmides 11

II. Milieux de culture, solutions d'antibiotiques, conditions de croissance et de conservation 11

III. Test de sporulation 12

IV. Extraction d'ADN, digestion et électrophorèse 12

A. Extraction de l'ADN génomique de *S. ambofaciens* 12

B. Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli* 12

C. Digestion de l'ADN 13

D. Séparation des fragments de restriction 13

V. Transfert d'ADN sur membrane 13

VI. Marquage des sondes d'ADN, hybridation et révélation par bioluminescence 13

A. Marquage des sondes d'ADN....13
B. Hybridation et détection....14
VII. Conditions de ligation....14
VIII. Transformation d'*E. coli*....14
IX. Conjugaison entre souches d'*E. coli*....15
X. Conjugaison entre *E. coli* et *S. ambofaciens*....15
XI. Extraction des lipides intracellulaires et des macrolides de *Streptomyces*....15
XII. Analyse des composés lipidiques en Chromatographie en Couche Mince (CCM)....16
XIII. Test de l'activité antibiotique....16
XIV. Analyses statistiques....16

RESULTATS....17
I. Sélection d'un hôte potentiel de clonage parmi des mutants Pig⁻pap....17
A. Absence de délétion dans des homologues de gènes *whi* de *S. coelicolor* chez plusieurs mutants Pig⁻pap....17
B. Etude de l'instabilité génétique et génomique de quelques mutants Pig⁻pap....18
1. Estimation du taux de réversion chez 5 mutants Pig⁻pap....18
2. Etude de l'instabilité génétique et génomique des souches WT8p8 et WT8p25....18
C. Détermination de l'aptitude de deux mutants Pig⁻pap à conjuguer....19
D. Choix de la souche WT8p25 comme hôte de clonage....20
II. Construction d'une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* et criblage partiel....20
A. Fabrication de la souche donneuse *E. coli* MRF'307....20
B. Réalisation de la banque d'ADN génomique de WT8 chez *E. coli* MRF'307....21
C. Criblage d'une partie de la banque d'ADN génomique par conjugaison intergénérique *E. coli* et *S. ambofaciens* WT8p25....21
III. Isolement et caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1....22
A. La sporulation n'est pas restaurée chez la souche 29C1....22
B. Caractérisation moléculaire de la souche 29C1....23
1. La souche 29C1 est un dérivé de *S. ambofaciens* ATCC23877....23
2. Vérification de la présence d'un plasmide recombinant intégré....23
3. Identification du clone recombinant....24
4. La souche 29C1 possède un réarrangement de grande taille dans son génome....24
C. Recherche d'un composé pigmenté chez la souche 29C1....25

DISCUSSION-PERSPECTIVES.....27
I. La souche WT8p25 est un hôte potentiel de clonage.....27
II. Criblage de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* construite chez *E. coli* MRF'307.....28
III. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1.....29
IV. Perspectives.....30

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....31

ABREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADS	:	Amplified DNA Sequence
$Amp^{R/S}$	:	Résistance ou Sensibilité à l'ampicilline
Amy	:	Aerial mycelium
$Apra^{R/S}$	:	Résistance ou Sensibilité à l'apramycine
ARN	:	Acide Ribonucléique
ATCC	:	American Type Culture Collection
AUD	:	Amplifiable Unit of DNA
BET	:	Bromure d'Ethidium
CCM	:	Chromatographie en Couche Mince
CDP-Star	:	4-chloro-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate
CHEF	:	Contour Clamped Homogeneous Electric Field
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
DIG	:	Digoxygénine
DIG-dUTP	:	Digoxygénine-11-Déoxyuridine TriPhosphate
DO	:	Densité Optique
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
HT	:	Hickey-Tresner
IPTG	:	Isopropyl-β-D-thio-galacto-pyranoside
IS	:	Insertion Sequence
$Kan^{R/S}$	:	Résistance ou Sensibilité à la kanamycine
kb	:	kilobases
LB	:	Luria Bertani
LMPA	:	Low Melting Point Agarose
Mb	:	Mégabases
MS	:	Matière sèche
$Nal^{R/S}$	:	Résistance ou Sensibilité à l'acide nalidixique
NSA	:	Nancy Streptomyces Ambofaciens
npc	:	nombre de papilles par colonie
pb	:	paire de bases
PFGE	:	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
Pig^{+}	:	Colonie sauvage pigmentée
$Pig^{-}col$	:	Mutant dépigmenté issu d'une colonie dépigmentée
Pigdef	:	Colonie légèrement pigmentée
$Pig^{+}pap$	:	Colonie pigmentée à papilles dépigmentées
$Pig^{-}pap$	:	Mutant dépigmenté issu d'une papille dépigmentée
$Pig^{+}sec$	:	Colonie pigmentée à secteur dépigmenté
$Pig^{-}sec$	:	Mutant dépigmenté issu d'un secteur dépigmenté

Pig_{vert}	:	Colonie pigmentée verte
qsp	:	quantité suffisante pour
Rf	:	Rapport frontal
RP	:	Rhône-Poulenc
rpm	:	rotations par minute
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
$Spi^{+/-}$	:	Producteur (+) ou non producteur (-) de spiramycine
SSC	:	Standard Sodium Citrate
SSM	:	Slipped Strand Mispairing
TAE	:	Tris-Acétate-EDTA
TBE	:	Tris-Borate-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
$Tet^{R/S}$	:	Résistance ou Sensibilité à la tétracycline
TIR	:	Terminal Inverted Repeat
Tn	:	Transposon
Tris	:	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TSB	:	Tryptic Soy Broth
UFC	:	Unité Formant Colonie
UP	:	Ultra Pure
UV	:	Ultra-Violet
WT	:	Wild Type
X-Gal	:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
YEME	:	Yeast Extract Malt Extract

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

INTRODUCTION

Les microorganismes disposent d'une grande variété de mécanismes leur permettant de s'adapter et donc de survivre à des changements brusques des conditions environnementales. Bien que tous ces mécanismes aboutissent à une adaptation de l'organisme à un environnement donné, il est néanmoins possible de les diviser en 2 grandes classes. La première comprend l'ensemble des mécanismes de régulation de l'expression des gènes qui, via une cascade d'événements moléculaires, permettent à l'individu de moduler son métabolisme. La deuxième classe comporte l'ensemble des mécanismes qui modifient la constitution génétique de la population générant ainsi un polymorphisme génétique. Celui-ci permet ainsi la survie de la population grâce à la sélection des individus les plus adaptés. Bien qu'elles ne modifient pas la séquence nucléotidique, les épimutations sont aussi transmissibles à la descendance (Holliday, 1994) et font ainsi partie de la deuxième classe de mécanismes. Ces mécanismes mutationnels ou épimutationnels peuvent affecter à haute fréquence des gènes particuliers, alors qualifiés de gènes mutables.

I. Notion de gènes mutables et d'états mutateurs

Le taux de mutation n'est pas constant en différents endroits d'un génome. Ainsi, au sein d'un même génome, certains loci sont qualifiés de mutables car présentent un taux de mutation très élevé, alors que d'autres présentent un taux de mutation plus faible. Les gènes mutables ne sont pas absolument nécessaires à la vie cellulaire. Chez les bactéries pathogènes, beaucoup de gènes impliqués dans la virulence font par exemple partie de ce type de gènes. Les gènes codant les LPS (LipoPolySaccharides), les toxines, les fibrilles, les éléments des capsules, entre autres, sont affectés par ces mécanismes mutationnels ou épimutationnels. Les gènes mutables sont également présents chez d'autres bactéries, dont les bactéries du genre *Streptomyces*. En effet, les gènes impliqués dans la différenciation morphologique et physiologique de cette bactérie sont mutés à haute fréquence. Il a été proposé de regrouper ces gènes sous le terme de gènes de contingence. Ils se différencient des autres gènes, qualifiés de gènes de ménage, qui sont, quant à eux, impliqués dans des fonctions exprimées de façon constitutive dans la cellule (Moxon *et al.*, 1994).

Le fait que des gènes de mutabilité différente coexistent au sein d'un même génome et s'y maintiennent suggère que cela pourrait être le résultat d'une évolution adaptative résultant d'une sélection s'appliquant, cette fois-ci, au niveau du génome. En effet, il peut être avantageux que certains gènes présentent des taux de mutation plus élevés que d'autres afin de modifier rapidement le phénotype de quelques individus au sein d'une population, en réponse à un changement environnemental, tout en conservant les fonctions essentielles codées par les autres gènes (Moxon *et al.*, 1994). Ces individus présenteront une valeur adaptative plus élevée que les autres et deviendront prépondérants dans certaines conditions.

Dans certaines conditions environnementales, ou après mutation de certains gènes, le taux de mutation de certains gènes, et notamment des gènes mutables, peut être augmenté. La bactérie

est alors dans un état qualifié de mutateur qui peut être transitoire ou transmis à la descendance pendant de nombreuses générations. Chez *Escherichia coli*, l'étude de mutants, qualifiés de mutateurs car présentant des taux de mutation 100 fois supérieurs à ceux d'une souche sauvage, a notamment permis de découvrir les gènes impliqués dans la correction des mésappariements ou dans la recombinaison homéologue, tels que les gènes *mutS* et *mutL* (Modrich, 1991 ; Rayssiguier *et al.*, 1989). Il a également été mis en évidence qu'un état mutateur pouvait se mettre en place lorsque les cellules entrent en phase stationnaire et donc ne se divisent plus. Cet état mutateur, qualifié alors de transitoire, affecte quelques cellules de la population. Il résulte notamment d'une limitation de la protéine MutL durant la phase stationnaire (Harris *et al.*, 1997). Ainsi, l'établissement de cet état mutateur va générer, au sein d'une même population, une grande diversité génétique et donc phénotypique entre les individus.

II. Les mécanismes impliqués dans la mutabilité des gènes de contingence chez les bactéries

Les mécanismes mutationnels affectant les gènes mutables impliquent fréquemment des réorganisations du génome qui peuvent aboutir à une modulation de l'expression génique et/ou à une diversification allélique. En terme d'évolution, ces mécanismes mutationnels sont stochastiques car, bien que spatialement programmés, ils peuvent avoir lieu à tout moment et ne sont pas produits pour conférer un avantage à la bactérie (Moxon *et al.*, 1994). Par ailleurs, des modifications épigénétiques peuvent également affecter à haute fréquence certains gènes et sont héritables (Holliday, 1994). C'est pourquoi, les mécanismes mutationnels ainsi que les mécanismes épimutationnels seront considérés dans ce chapitre.

A. La transposition

Les éléments transposables représentent une source de variabilité importante. Leur transposition peut générer une diversification allélique et modifier l'expression soit du gène où l'insertion a eu lieu, soit du (ou des) gène(s) adjacent(s) par effet polaire. Si de nombreux éléments transposables ne présentent pas de spécificité particulière d'intégration, d'autres tels que IS*30* chez *E. coli* ou Tn*4351* de *Bacteroides fragilis* s'intègrent au contraire dans des sites spécifiques (Lynn *et al.*, 1995 ; Olasz *et al.*, 1998). Par ailleurs, bien que la plupart des éléments transposables se transposent à basse fréquence (entre 10^{-6} et 10^{-8}), certains au contraire se transposent à plus haute fréquence (entre 10^{-3} et 10^{-4}) (Chalmers et Blot, 1999). Si la transposition à haute fréquence est site-spécifique, le gène affecté sera qualifié de gène mutable. C'est par exemple le cas du locus codant un exopolysaccharide chez *Pseudomonas atlantica* (Bartlett *et al.*, 1988). Les éléments transposables peuvent être considérés comme des éléments mutateurs car pouvant créer des délétions ou des réarrangements au niveau du site d'insertion (Chao *et al.*, 1983).

Bien que l'inactivation d'une fonction par interruption du gène par un élément transposable peut souvent apparaître délétère (Orgel *et al.*, 1980 ; Syvanen, 1984), il a été montré qu'elle pouvait conférer un avantage adaptatif immédiat au mutant. Par exemple, chez *Xanthomonas campestris*, bactérie pathogène du poivron, un gène d'avirulence, inducteur de la réponse de défense de l'hôte, peut être inactivé à haute fréquence. Cette inactivation est le résultat de l'insertion de

l'IS*476* dans ce gène. L'individu porteur de cette mutation a alors un spectre d'hôtes plus large (Kearney et Staskawicz, 1990).

B. Le transfert horizontal

Le transfert horizontal peut être défini comme l'acquisition d'un fragment d'ADN étranger par conjugaison, transformation ou transduction. Pour se maintenir dans le génome, ce fragment d'ADN doit posséder une origine de réplication fonctionnelle ou s'intégrer dans un réplicon. Cette acquisition peut conduire à la formation d'une structure chimérique ou mosaïque définie comme un assemblage de séquences d'ADN non apparentées, résultant de recombinaison entre génomes d'origines différentes. Si la nouvelle fonction codée par ce gène augmente la valeur adaptative, encore appelée "fitness", de la bactérie, il sera maintenu dans le génome.

Ainsi, il a été mis en évidence chez *Helicobacter pylori*, bactérie pathogène de l'homme, une structure chimérique au niveau d'une région hypervariable correspondant à un îlot de pathogénicité. La comparaison des séquences de cette région chez 2 souches d'*H. pylori*, a révélé la coexistence de séquences presque identiques avec des séquences totalement différentes. Dans ce cas, les recombinaisons entre séquences d'origines différentes, impliquées dans la formation de structures chimériques, sont responsables de la variabilité du degré de virulence entre souches (Alm *et al.*, 1999). Un autre exemple concerne le locus CPS codant les exopolysaccharides nécessaires pour la synthèse de capsule chez *Streptococcus pneumoniae*. Ce locus présente une structure chimérique issue d'échanges de matériel génétique entre différentes souches (Morona *et al.*, 1999a). Cette grande diversité d'exopolysaccharides produits permet à ces bactéries pathogènes d'échapper plus efficacement au système immunitaire de l'hôte.

C. La recombinaison homologue

Il s'agit d'un mécanisme central de la cellule, également impliqué dans les processus de variation de phase. Le processus de variation de phase a été notamment mis en évidence chez des bactéries pathogènes et confère à ces bactéries la capacité de s'adapter à différentes niches écologiques.

La variation antigénique est une variante du mécanisme de variation de phase aboutissant à l'expression d'une grande variété de protéines. Chez les bactéries pathogènes, la variation antigénique affecte très souvent des gènes impliqués dans la synthèse de structures de surface comme les pili, les fibrilles, les flagelles, les protéines de la membrane externe ou encore les LPS (Dybvig, 1993). Par exemple, la synthèse du pilus de type IV chez *Neisseria gonorrhoeae* dépend de ce mécanisme de régulation (Mehr et Seifert, 1998). Dans ce cas, le gène mutable est le gène *pilE* (E pour Expressed) codant la sous-unité structurale du pilus. Plusieurs copies de ce gène sont réparties sur le chromosome. La région 5' codante de ce gène peut être délétée par des événements de conversion génique. Les allèles résultants, nommés *pilS* (S pour Silent), codent pour des protéines solubles, sécrétées hors de la cellule (Haas *et al.*, 1987). Ainsi, un "switch" d'un état ON (production de pili) à un état OFF (non production de pili) est observé à grande fréquence. Un autre type de pili peut être généré par recombinaison entre *pilS* et *pilE*. Cette protéine variante produite nommée PilL s'accumule au niveau du périplasme et/ou au niveau de la membrane

externe (Seifert, 1996). Un autre type de variation antigénique est trouvé chez *Borrelia hermsii* où des gènes codant les protéines Vmp (Variable major protein), protéines de la membrane externe, sont affectés (Barbour, 1993). Il s'agit également d'un mécanisme de conversion génique où le gène exprimé est remplacé par une copie silencieuse de ce gène présente dans un locus distinct.

D. La recombinaison site-spécifique

Un autre mécanisme mutationnel présent chez de nombreuses bactéries est la recombinaison site-spécifique. Celle-ci peut induire des inversions ou des délétions au niveau de sites spécifiques, responsables d'une modulation de l'expression d'un gène qualifié de mutable et localisé dans ou à proximité de la région réversible (Henderson *et al.*, 1999). Ce mécanisme est impliqué notamment dans la régulation de la synthèse de pili de type I d'*E. coli* et des flagelles de *Salmonella typhimurium*, 2 exemples très étudiés. La variation de phase des fibrilles de type I est médiée par l'inversion d'une région chromosomique de 314 pb localisée en amont du gène *fimA*, codant la sous-unité structurale (figure 1) (Abraham *et al.*, 1985). En phase ON, le promoteur est en position correcte et la transcription de *fimA* peut être initiée, ce qui n'est pas le cas après inversion (phase OFF). L'inversion de ce segment d'ADN est sous le contrôle des produits des gènes *fimB* et *fimE*, en plus des protéines régulatrices H-NS, IHF (Integration Host Factor) et Lrp (Leucine responsive regulatory protein) (Blomfield *et al.*, 1997 ; Dorman et Higgins, 1987). Un autre système impliquant des événements de recombinaison site-spécifique est retrouvé chez *Salmonella*. Ce système donne lieu à une variation de phase complexe et concerne 2 types de flagelle H1 et H2 (figure 2). La région réversible, d'une taille de 966 pb, contient le promoteur permettant la transcription du gène codant le flagelle H2 et le gène répresseur (*rh1*). En phase ON$_{H2}$/OFF$_{H1}$, ces 2 gènes sont codés et le produit du gène *rh1* réprime la transcription du gène *h1* codant le flagelle H1. En phase ON$_{H1}$/OFF$_{H2}$, le promoteur en sens inverse ne permet plus la transcription des gènes *h2* et *rh1*. Le gène *h1* est alors transcrit (Henderson *et al.*, 1999). Cette inversion nécessite la recombinase site-spécifique Hin et les protéines Fis et HU. Ce complexe est appelé invertasome (Heichman et Johnson, 1990).

E. La recombinaison illégitime

La recombinaison illégitime peut avoir lieu au niveau de segments d'ADN répétés. Ces régions à répétitions sont des points chauds d'appariements anormaux transitoires lors de la réplication de l'ADN. Ce processus est appelé mésappariement par glissement de brin ou SSM pour Slipped-Strand Mispairing. Le nombre d'unités répétées peut varier et provoquer des changements au niveau de l'expression d'un ou plusieurs gène(s). En fait, la variation de phase, résultat d'une variation du nombre de répétitions, peut influencer soit la transcription d'un gène si ces répétitions sont situées en amont de ce gène, soit la traduction si ces répétitions sont situées dans la phase codante du gène (Henderson *et al.*, 1999).

1. Le contrôle transcriptionnel

La modulation de l'expression d'un gène par glissement de brin pendant la transcription est le résultat d'un événement de SSM dans une région distincte de la région codante du gène, généralement localisée en amont du gène cible. Une protéine de la membrane externe de *Neisseria*

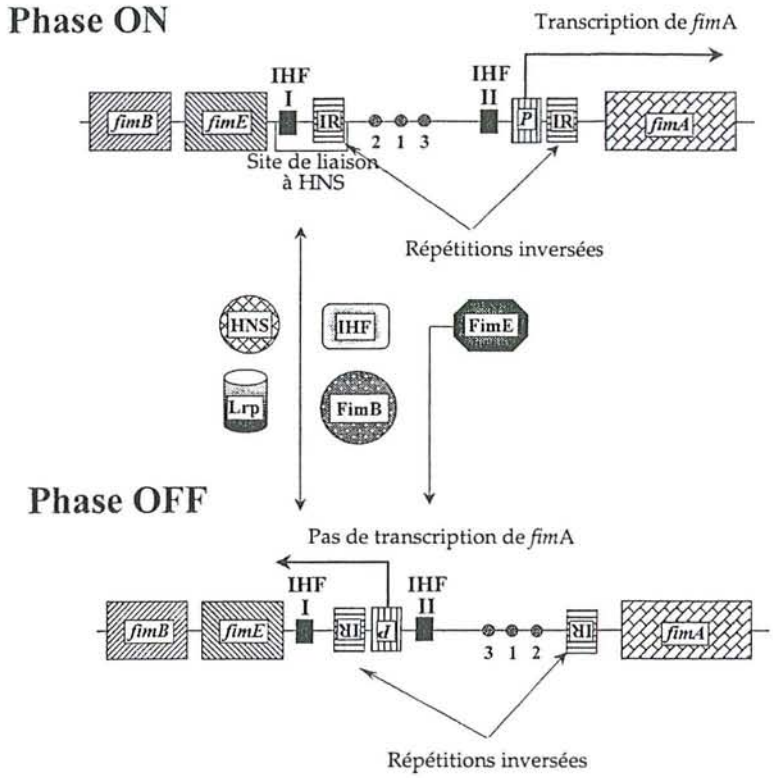


Figure 1. Mécanisme de variation de phase du gène *fimA* impliqué dans la synthèse de fibrille chez *E. coli*. La région réversible, contenant le promoteur P et 3 sites de liaison à la protéine Lrp, est flanquée par 2 répétitions inversées de 9 pb nommées IR (Inverted Repeat). Les intégrases FimE et FimB dirigent l'inversion par un mécanisme qui implique la participation des protéines H-NS, Lrp et IHF (d'après Henderson *et al.*, 1999).

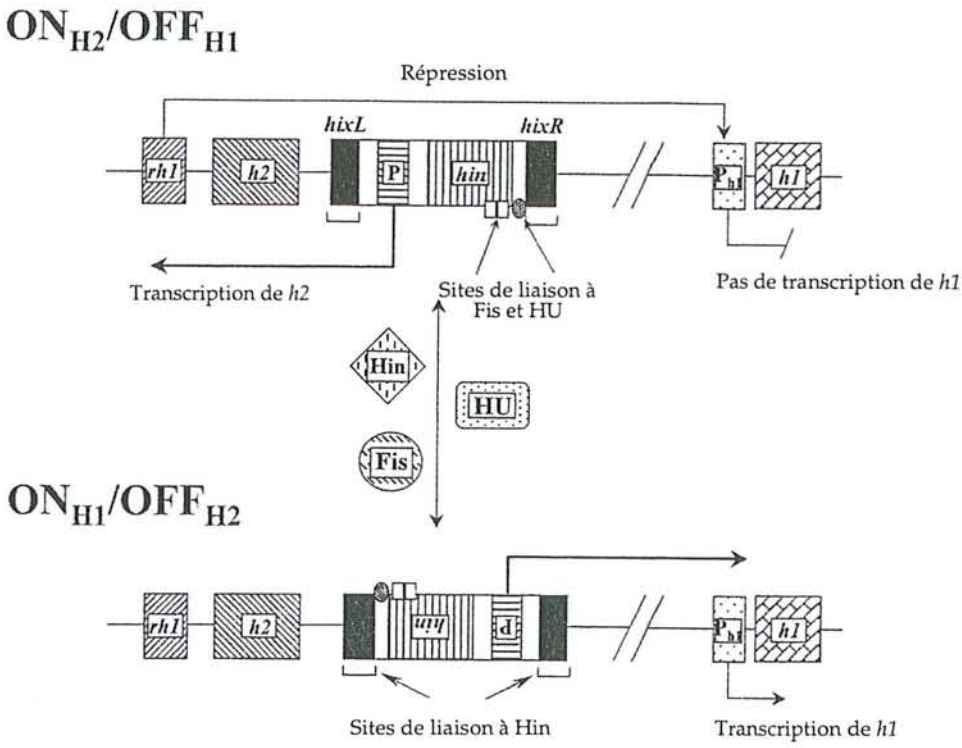


Figure 2. Mécanisme de variation de phase des gènes codant les flagelles H1 et H2 de *S. typhimurium*. La région réversible de 966 pb est flanquée par 2 répétitions inversées (*hixL* et *hixR*). En orientation ON pour H2, les gènes *h2* et *rh1* sont exprimés à partir du promoteur P. La protéine codée par le gène *rh1* réprime la transcription de *h1*. En orientation ON pour H1, le promoteur est dirigé dans le sens inverse et ne permet plus la transcription des gènes *h2* et *rh1*. La position du gène de la recombinase site-spécifique *hin* est indiquée ainsi que l'implication des protéines Hin, Fis et HU (d'après Henderson *et al.*, 1999).

meningitidis, appelée Opc, présente ce type de régulation (Sarkari *et al.*, 1994). Les changements de phase sont produits par glissement de brin au niveau d'une région riche en cytosines localisée entre les régions -10 et -35 du promoteur du gène *opc*. Lorsque le nombre de cytosines est de 12 ou 13, la bactérie produit la protéine Opc. Si ce nombre est égal à 11 ou 14, les transcrits du gène *opc* sont 10 fois moins abondants. De plus, quand le nombre de cytosines est supérieur à 15 ou inférieur à 10, aucun ARNm de *opc* n'est détecté. Ce type de régulation est également retrouvé chez *H. influenzae* au niveau du gène *hif* codant les fibrilles LKP (van Ham *et al.*, 1993).

2. Le contrôle traductionnel

Les gènes *opa* de *N. gonorrhoeae* constituent un exemple de ce type de mécanisme. Ces gènes codent des antigènes de surface impliqués dans l'interaction cellule/hôte. Il existe une grande diversité antigénique de cette protéine. Plusieurs copies du gène codant *opa* sont localisées à différents loci sur le chromosome. Chaque copie porte une répétition CTTCT. En fonction du nombre de répétitions, le gène *opa* peut être traduit ou pas (Stern *et al.*, 1986). En phase ON, le gène peut présenter 6, 9 ou 12 répétitions, ce qui permet au codon d'initiation ATG d'être en phase et donc l'expression de la protéine mature. Dans le cas contraire, des protéines tronquées ou aberrantes sont produites. Cette variation du nombre de répétitions est le résultat d'un mésappariement par glissement de brin (SSM). Le contrôle traductionnel de la variation de phase par SSM a également été identifié chez *Bordetella pertussis* au niveau du gène *bvg*S codant la protéine BvgS, protéine régulatrice de la virulence (Stibitz *et al.*, 1989). Chez *H. pylori*, 27 gènes, présentant des séquences répétées impliquées dans la variation de phase, seraient régulés par ce mécanisme. Les protéines codées par ces gènes mutables interviendraient dans la biosynthèse de LPS, dans les systèmes de restriction/modification ou seraient des protéines de surface (De Bolle *et al.*, 2000 ; Saunders *et al.*, 1998).

F. L'épimutation

L'épimutation peut être définie comme une modification réversible de l'ADN. Elle est transmissible à la descendance et n'altère pas la séquence nucléotidique (Holliday, 1994). L'épimutation peut affecter des sites spécifiques et ainsi moduler l'expression de certains gènes. La méthylation site-spécifique et la modification de la conformation de l'ADN sont des mécanismes d'épimutation.

1. La méthylation site-spécifique

La variation phénotypique peut être médiée par une méthylation différentielle faisant intervenir des protéines régulatrices qui, en coopérant, altèrent à haute fréquence la transcription d'un gène mutable. Un exemple impliquant ce type de régulation est retrouvé chez *E. coli*. Cette bactérie produit plusieurs types de pili, facteurs de virulence, reconnaissant des récepteurs distincts de l'hôte. Le niveau de production de pili est régulé par la bactérie en réponse aux facteurs environnementaux comme la température, la source de carbone, le pH ou le taux d'oxygène (Moxon *et al.*, 1994). La variation de phase de l'opéron *pap* (pour Pyelonephritis Associated Pili) chez *E. coli* n'implique pas de réarrangement d'ADN mais une méthylation différentielle de 2 séquences GATC notées GATC-I et GATC-II dans la région *pap* (figure 3)

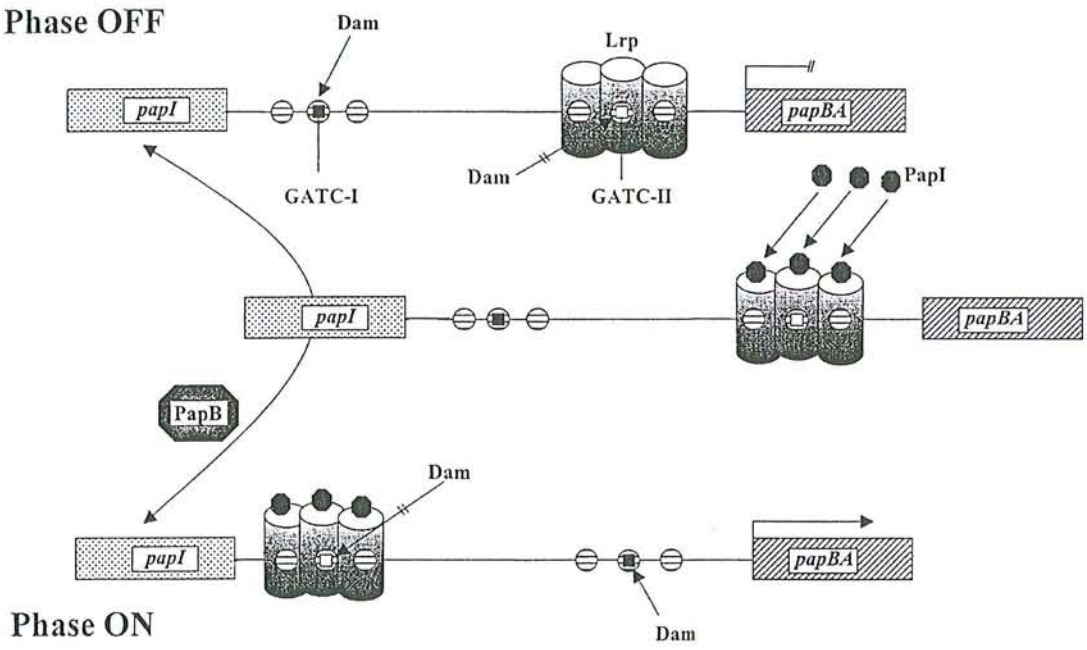


Figure 3. Variation de phase par méthylation différentielle au niveau de l'opéron *pap* d'*E. coli*. Les 2 sites GATC (GATC-I et GATC-II) sont méthylés différentiellement par action de la protéine Lrp et de la méthylase Dam. Le site non méthylé est indiqué par un carré blanc alors que le site méthylé est schématisé par un carré noir. L'état transcriptionnellement inactif (phase OFF) et l'état transcriptionnellement actif (phase ON) sont figurés ainsi que les protéines régulatrices PapI et PapB (d'après Henderson *et al.*, 1999).

(Braaten *et al.*, 1994). Dans les cellules exprimant ce type de pili codé par le gène *papBA* (état ON), le site GATC-I n'est pas méthylé alors que le site GATC-II l'est. Le cas contraire se produit dans des cellules en état OFF (Abraham et Beachey, 1987). La protéine Lrp qui bloque la méthylation des séquences GATC et la protéine Dam (DeoxyAdenosin Methyltransferase) qui méthyle le résidu A de la séquence GATC sont 2 protéines nécessaires pour la variation de phase et pour le maintien de la méthylation différentielle des 2 sites GATC. La protéine PapI de l'opéron *pap* jouerait également un rôle essentiel dans cette variation de phase, en modulant la liaison de la protéine Lrp (Nou *et al.*, 1993). Les opérons *sfa* et *daa* d'*E. coli*, codant aussi pour la synthèse de pili, ou l'expression de la protéine Pef chez *S. typhimurium* sont contrôlés par des mécanismes de variation de phase méthylation-dépendante similaires à celui décrit précédemment (Nicholson et Low, 2000 ; van der Woute et Low, 1994).

2. La modification de la conformation de l'ADN

L'inactivation de l'expression génique par condensation de la chromatine a longtemps été considérée comme un processus spécifique aux eucaryotes. Cependant, des exemples impliquant cette régulation ont été mis en évidence chez *E. coli*. Il faut savoir que le chromosome bactérien est associé à des protéines de liaison à l'ADN appelées "Histone-like" incluant les protéines HU et H-NS. L'ensemble forme une structure condensée : le nucléoïde (Tupper *et al.*, 1994). Chez *E. coli*, le silencing de l'opéron *bgl* impliqué dans l'utilisation des ß-glucosides a été mis en évidence (Ohta *et al.*, 1999). La protéine H-NS, en coopération avec la fonction codée par le gène *rpo*S causerait la non expression de cet opéron en se liant au niveau du promoteur.

G. Modulation de la fréquence des mutations ponctuelles et des délétions

La grande mutabilité de certains gènes peut également résulter de mutations ponctuelles ou de délétions. Il a été montré chez *Mycobacterium smegmatis* que les mutants spontanés résistants à la streptomycine, produits à haute fréquence, seraient issus, dans la majorité des cas, de mutations ponctuelles affectant seulement 2 codons dans le gène *rpsL*, codant la protéine ribosomique S12 (Wu *et al.*, 1990). Par ailleurs, l'étude de l'instabilité génétique chez *Streptomyces* a révélé que des événements de délétions produits à haute fréquence affectaient plus particulièrement certains gènes. Cet exemple sera développé par la suite.

III. Les gènes mutables chez les bactéries du genre *Streptomyces*

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses, Gram+, à haut pourcentage en G+C dont l'habitat est le sol. Leur chromosome présente une taille estimée à 8 Mb (Leblond *et al.*, 1990b ; Lin *et al.*, 1993). Ces bactéries présentent une instabilité génétique qui se caractérise par l'apparition à haute fréquence ($>10^{-3}$) de mutants dans la descendance d'une colonie sauvage. Au niveau moléculaire, cette instabilité est corrélée à une instabilité génomique caractérisée par des réarrangements chromosomiques affectant plusieurs centaines de kb à chaque fois (Leblond *et al.*, 1990a). Ces réarrangements consistent en des délétions et/ou des amplifications de séquences d'ADN voisines appelées ADS ("Amplified DNA Sequence"). Une ADS correspond à une réitération en tandem d'une unité d'ADN amplifiable appelée AUD

("Amplifiable Unit of DNA") (Fishman et Hershberger, 1983). Le chromosome de *Streptomyces* est linéaire (Leblond *et al.*, 1996 ; Lezhava *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1993) et possède une structure invertronique caractérisée par la présence de séquences terminales répétées inversées appelées TIR (Terminal Inverted Repeat) liées de façon covalente à des protéines. Tous les réarrangements observés affectent les extrémités du chromosome ainsi que sa structure puisque certains chromosomes délétés sont circulaires (Fischer *et al.*, 1997a ; Rauland *et al.*, 1995 ; Volff *et al.*, 1997).

La taille des délétions les plus grandes observées, sans que la viabilité des mutants ne soit affectée, a été estimée à environ 1000 kb chez *S. lividans* et *S. coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1993) et 2000 kb chez *S. ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1991). Cela suggère que ces extrémités ne contiennent pas de gènes essentiels dans les conditions de laboratoire. Cependant, cette région n'est pas vide de gènes (Aigle *et al.*, 1996 ; Dary *et al.*, 1993 ; Schneider *et al.*, 1993) mais au contraire activement exprimée. Ainsi, les gènes présents dans ces régions sont hautement mutables, non indispensables et peuvent donc être considérés comme des gènes de contingence. La plupart d'entre-eux codent des caractères impliqués dans le métabolisme secondaire (ex : production de pigment, production d'antibiotique) et/ou la différenciation morphologique (ex : formation du mycélium aérien, sporulation). Ce n'est qu'exceptionnellement que les gènes du métabolisme primaire, tel que le gène codant l'arginosuccinate synthétase (*arg*G) chez *S. lividans*, sont touchés (Ogawara *et al.*, 1993 ; Redenbach *et al.*, 1996) .

A. La différenciation de *Streptomyces*

Les bactéries du genre *Streptomyces* présentent une différenciation complexe, aussi bien d'un point de vue morphologique que physiologique.

1. La différenciation morphologique

Le développement d'une colonie sur milieu solide (figure 4) débute par la germination d'une spore, suivie par la croissance d'un mycélium végétatif constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ramifiés et multigénomiques. Le développement se poursuit par la formation d'un mycélium aérien non ramifié (Chater et Hopwood, 1984). Après arrêt de l'extension des hyphes aériens, les filaments mycéliens se subdivisent pour former des chaînes de spores unigénomiques (Chater, 1998). Au cours du développement de la colonie, des produits de stockage tels que des lipides ou du glycogène sont accumulés (Brana *et al.*, 1986 ; Olukoshi et Packter, 1994). L'analyse de mutants bloqués à différents stades de développement a permis d'élucider un certain nombre de mécanismes mis en jeu lors de la différenciation.

Deux principaux types de mutants affectés dans la différenciation morphologique ont été isolés chez *S. coelicolor* A3(2), souche la mieux caractérisée au sein du genre *Streptomyces*. Ce sont d'une part, les mutants *bld* ("bald"= chauve) qui ne produisent pas de mycélium aérien et d'autre part, les mutants *whi* ("white"= blanc) qui forment un mycélium aérien mais pas de spores matures (Chater et Hopwood, 1984).

Les mutants *bld* issus de *S. coelicolor* A3(2) déficients dans la formation du mycélium aérien

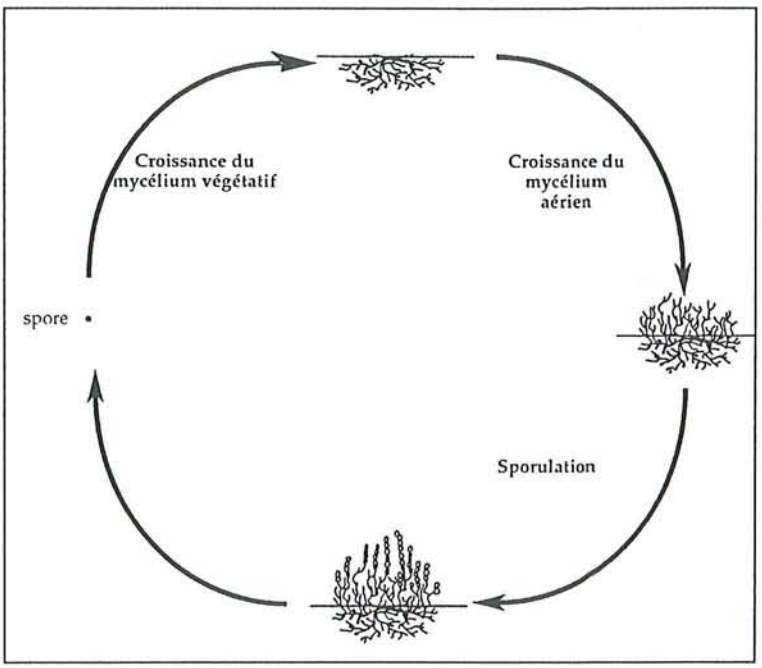


Figure 4. Représentation du développement morphologique des bactéries du genre *Streptomyces* (d'après Dary *et al.*, 2000).

sont des mutants conditionnels. Sur milieu minimum glucosé, ces mutants sont incapables de sporuler. En revanche, quand le glucose est remplacé par du mannitol, ces mutants sporulent (Chater *et al.*, 1989). Des résultats de complémentation entre mutants *bld* suggèrent l'existence d'une cascade de signaux (figure 5) conduisant à la production de la protéine SapB (Chater, 1993). Cette protéine diffuse dans le milieu et constitue un signal pour la formation du mycélium aérien. Elle faciliterait la croissance du mycélium en se fixant sur les hyphes aériens (Chater, 1998 ; Nodwell *et al.*, 1999 ; Willey *et al.*, 1993). Il est à noter que le gène *sap* est localisé dans la région instable chez *S. coelicolor* A3(2) et, de ce fait, est un gène mutable (Redenbach *et al.*, 1996).

Chez *S. coelicolor* A3(2), plusieurs classes de mutants *whi*, déficients dans la sporulation ont été décrites (Chater, 1998). Plusieurs loci, nommés *whiA, B, C, D, E, G, H, I* et *sigF*, ont été identifiés. Ils sont répartis sur le chromosome de *S. coelicolor* A3(2). Pour la plupart des mutants *whi*, un phénotype spécifique a été associé (Chater, 1998). Chacun des phénotypes, représentés dans la figure 6, semble résulter d'un blocage à des étapes morphologiques spécifiques. Les caractéristiques de différents gènes *whi* sont résumées dans le tableau 1. Tout comme chez *Bacillus subtilis*, une cascade de régulation de facteurs sigma pourrait régir la différenciation morphologique (Chater, 1998 ; Stragier et Losick, 1996). Lors de la différenciation morphologique, les *Streptomyces* mettent en place un métabolisme secondaire qui caractérise la différenciation physiologique.

B. La différenciation physiologique

La différenciation métabolique se traduit par la synthèse de produits non essentiels pour la croissance normale de la bactérie. C'est pourquoi ce métabolisme est qualifié de secondaire. Les bactéries du genre *Streptomyces* produisent 60% des antibiotiques bactériens connus. De plus, des pigments, des anabolisants, des immunosuppresseurs, des anticancéreux, des insecticides, des herbicides et des enzymes extra-cellulaires sont également synthétisés (Caillet-Fauquet *et al.*, 1984). La différenciation physiologique est induite à un moment précis de la croissance, c'est-à-dire lors de l'entrée en phase stationnaire ou au début de la différenciation du mycélium aérien. Les gènes de biosynthèse des antibiotiques sont regroupés sur le chromosome sous forme de cluster. Dans la plupart des cas, le(s) gène(s) de biosynthèse d'un antibiotique est (sont) associé(s) à au moins un gène de résistance de cet antibiotique et au gène de régulation de la production de ce métabolite. Cette organisation est retrouvée par exemple pour la synthèse d'actinorhodine chez *S. coelicolor* (Fernandez-Moreno *et al.*, 1991) ou encore pour la synthèse de spiramycine chez *S. ambofaciens* (Richardson *et al.*, 1990). Chez *S. fradiae*, le cluster de biosynthèse de la tylosine est situé dans la partie délétable du chromosome, et c'est également le cas du cluster de biosynthèse de l'oxytétracycline chez *S. rimosus* (Caillet-Fauquet *et al.*, 1984 ; Pandza *et al.*, 1997).

IV. Les gènes mutables chez *Streptomyces ambofaciens*

A. La pigmentation des colonies est un caractère mutable

Chez *S. ambofaciens*, espèce étudiée au laboratoire, la pigmentation des colonies est un caractère mutable. Dans la descendance d'une colonie pigmentée qualifiée de sauvage, 4 phénotypes prépondérants, c'est-à-dire présents à des fréquences supérieures à 1%, sont

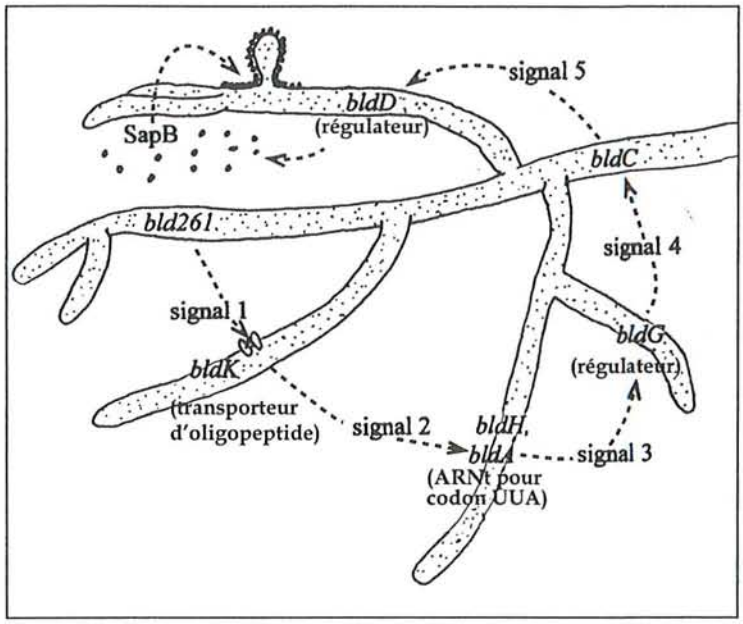


Figure 5. Représentation de la cascade de signaux conduisant à la production de la protéine SapB (d'après Chater *et al.*, 1998). Les différents gènes *bld* intervenant dans cette cascade sont indiqués sur la figure.

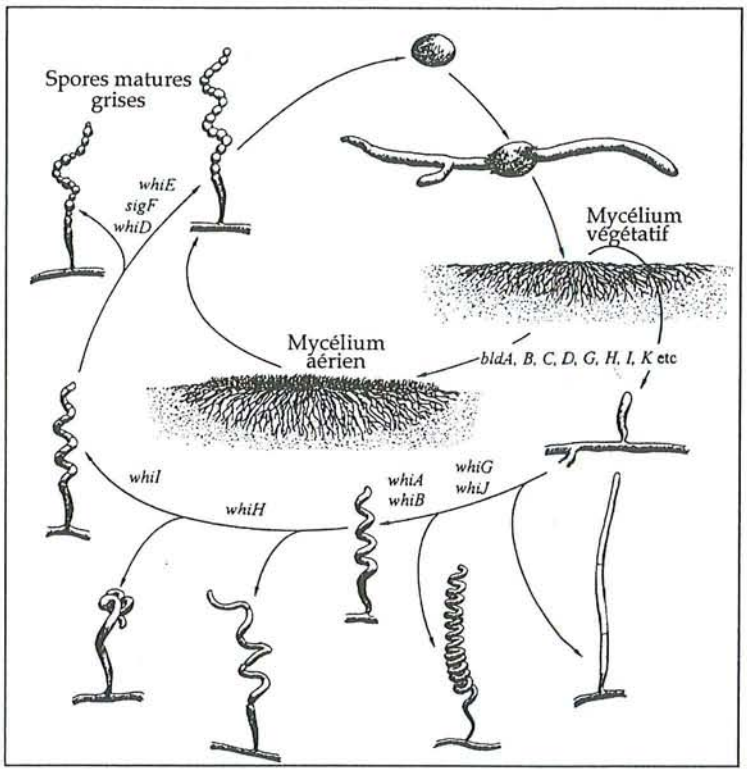


Figure 6. Les gènes impliqués au niveau du développement morphologique de *Streptomyces*. La métamorphose progressive d'un hyphe aérien en chaîne de spores est schématisée sur la figure. De plus, est indiqué le moment où les gènes *whi* sont actifs au cours du développement (d'après Chater *et al.*, 1998).

Gène	Fonction codée	Caractéristiques
whi G	Facteur sigma	- élément clé pour le déclenchement de la sporulation - niveau de transcription constant - le phénotype mutant présente des hyphes aériens droits
whi C	?	- le phénotype mutant présente des hyphes aériens droits
whi A	?	- le phénotype mutant présente des hyphes aériens légèrement enroulés
whi B	Facteur transcriptionnel riche en Cys	- protéine cytoplasmique de 87 acides aminés - le phénotype mutant présente des hyphes aériens légèrement enroulés - contrôle l'expression de *whiE*
whi D	Facteur transcriptionnel riche en Cys	- protéine de 112 acides aminés - le phénotype mutant est marqué par une irrégularité dans l'emplacement des subdivisions et la majorité des spores produites sont lysées
whi H	Fonction similaire à un répresseur	- le phénotype mutant présente des hyphes aériens peu enroulés
whi I	?	- le phénotype mutant présente des hyphes aériens peu enroulés et peu fragmentés
sig F	Facteur sigma	- régule les étapes tardives de la sporulation - transcription restreinte au compartiment pré-spore
whi E	Enzyme de biosynthèse de pigment associé aux spores matures	- régule la dernière étape de la sporulation - homologie avec les gènes impliqués dans la synthèse des antibiotiques de type polycétonique

Tableau 1. Récapitulatif des fonctions codées par des gènes *whi* et des caractéristiques de leur implication au cours du développement de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (d'après Davis et Chater, 1992 ; Potuckova *et al.*, 1995 ; Kelemen *et al.*, 1996 ; Chater, 1998 ; Molle *et al.*, 2000).

observés : pigmenté (Pig^+), dépigmenté (Pig^-_{col}), pigmenté à secteur dépigmenté (Pig^+_{sec}) et pigmenté à papille dépigmentée (Pig^+_{pap}). Les colonies dépigmentées sont interprétées comme le résultat d'un événement mutationnel survenu lors de la sporulation tandis que les secteurs et les papilles dépigmentés proviendraient d'événements survenus lors de la croissance du mycélium végétatif et aérien, respectivement (figure 7). La fréquence relative de ces 4 types de mutants dépend de l'âge de la culture (Martin *et al.*, 1998). Au niveau moléculaire, cette instabilité se traduit par des délétions et/ou des amplifications localisées aux extrémités du chromosome chez les mutants Pig^-_{col} ou les mutants issus de secteurs dépigmentés (qualifiés de mutants Pig^-_{sec}). Les ADS appartiennent pour la plupart à 2 familles : celle de l'AUD6 et celle de l'AUD90 (Demuyter *et al.*, 1988). L'AUD90 comporte un gène codant une polycétone synthétase dont l'amplification inhibe la production de spiramycine, probablement par déviation des métabolites indispensables à la production d'antibiotique (Aigle *et al.*, 1996 ; Dary *et al.*, 1992). L'AUD6, quant à elle, contient notamment 2 gènes : les gènes *spa2* et *spaR*. Le gène *spa2* est un homologue du gène *rspA* d'*E. coli*, impliqué dans la régulation du gène *rpoS*, et semble être impliqué dans le processus de différenciation (Aubert *et al.*, 1997 ; Schneider *et al.*, 1993). Bien que les mutants Pig^-_{col} et Pig^-_{sec} présentent une déficience pour la production de pigment dans la colonie, cette déficience est variable d'un mutant à un autre et la très grande majorité d'entre eux sporule. Les mutants Pig^-_{pap} (issus de papilles dépigmentées), quant à eux, présentent tous un phénotype totalement dépigmenté et la presque totalité est incapable de sporuler. De plus, ces mutants ne présentent pas de délétion détectable dans leur génome.

B. Modulation de l'instabilité génétique et génomique via l'établissement d'un état mutateur

L'analyse de mutants Pig^-_{col} et Pig^-_{sec} issus de plusieurs sous-clones sauvages de *S. ambofaciens* ATCC23877 a révélé l'existence d'une grande hétérogénéité entre les sous-clones sauvages (Martin *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 1999). Elle se traduit par une variation des fréquences des mutants Pig^-_{col}, Pig^-_{sec} et Pig^-_{pap} produits et des fréquences de délétion aux extrémités du chromosome suivant l'origine sauvage des mutants étudiés. L'analyse des colonies à papilles a montré que d'une part, le nombre de papilles par colonie (npc) est un caractère héritable et que d'autre part, les colonies possédant plus de 20 papilles présentent des niveaux élevés d'instabilité génétique. Ces colonies ont été qualifiées de mutatrices car elles produisent un grand nombre de papilles dépigmentées à leur surface (donc de mutants Pig^-_{pap}) et des mutants Pig^-_{col} à des fréquences très supérieures à celle de leur ancêtre sauvage. Au niveau moléculaire, l'analyse de mutants Pig^-_{col} issus de 3 mutateurs a révélé la même hétérogénéité, de variation des fréquences de délétion aux extrémités du chromosome, que chez les 3 sous-clones sauvages ancestraux (Martin *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 1999). Ces résultats ont conduit les auteurs à formuler l'hypothèse selon laquelle la modulation de l'instabilité observée résulterait de la mise en place d'un état mutateur d'intensité variable, de faible niveau chez les sous-clones sauvages et de haut niveau chez les mutateurs (Trobner et Piechocki, 1985).

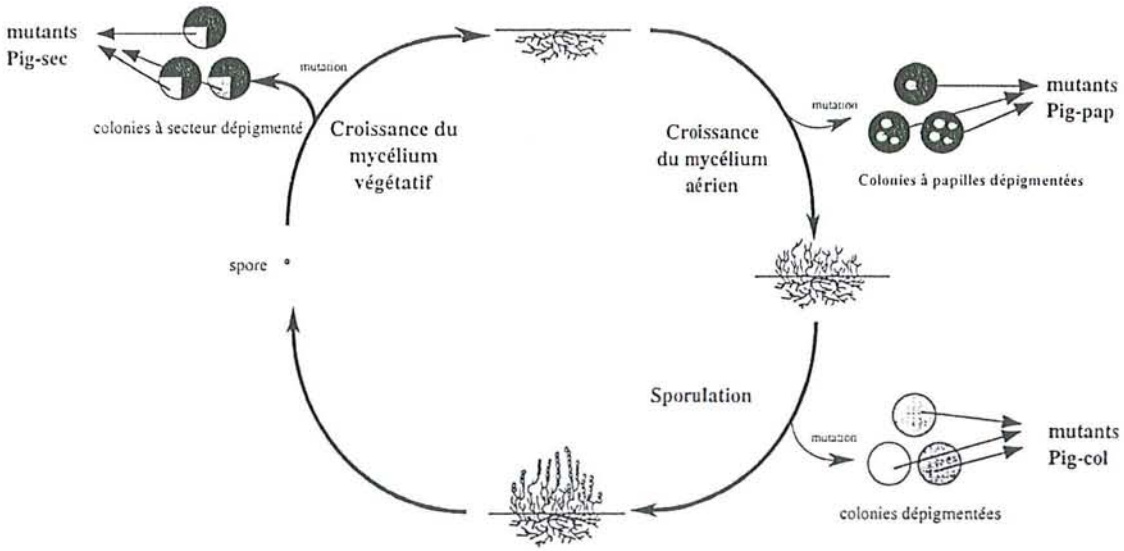


Figure 7. Représentation des différentes étapes du développement de *S. ambofaciens* et des phénotypes mutants observés au cours de ce développement (d'après Dary *et al.*, 2000).

IV. Objectif du travail

Dans le but d'identifier le déterminisme génétique de l'état mutateur, nous avons choisi d'identifier des gènes cibles de cet état qui sont mutés à haute fréquence chez les mutants $Pig^{-}pap$. L'absence de délétion détectable chez ces mutants en faisait *a priori* de bons candidats pour l'identification de tel(s) gène(s). Deux approches sont envisageables :

- la première consiste à tester si les mutants $Pig^{-}pap$ peuvent être complémentés par introduction de gènes connus chez *Streptomyces* pour intervenir dans la pigmentation et la sporulation (par exemple les gènes *whi* de *S. coelicolor*),
- la deuxième stratégie est d'identifier le (ou les) gène(s) muté(s) chez les mutants $Pig^{-}pap$ en réalisant un clonage par complémentation fonctionnelle. L'avantage d'une telle stratégie est de ne pas faire d'hypothèse quant à la nature du (ou des) gène(s) impliqué(s) et peut potentiellement permettre l'identification d'un nouveau gène intervenant dans la différenciation. Cette stratégie a été retenue lors de cette étude.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches bactériennes et plasmides

Les souches de *S. ambofaciens* utilisées dans ce travail sont présentées dans le tableau 2. Plusieurs souches d'*E. coli* ont également été employées dans ce travail et sont présentées dans le tableau 3. Le génotype partiel de la souche XL1MRF'Blue est le suivant : *Δ(mcrA), 183Δ (mcrCBhsdSMR mrr), 173endA1, supE44, thi1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB lacI^{q}Z ΔM15 Tn10(Tet^R)]*. La souche S17-1 porte un dérivé de RP4 codant les fonctions de transfert nécessaires à la conjugaison. Ce plasmide est intégré au chromosome de la souche. *Bacillus subtilis* ATCC6633 a été utilisée comme souche indicatrice de l'activité antibiotique des métabolites produits par *S. ambofaciens*.

Le plasmide conjugatif pSET152 (Bierman *et al.*, 1992) a été utilisé pour les expériences de conjugaison entre *E. coli* et *S. ambofaciens*. La carte de restriction de ce plasmide est présentée dans la figure 8. Ce plasmide a une taille de 5,8 kb. Le plasmide pUB307 (Bennett *et al.*, 1977), dérivé du plasmide RP1, est capable de mobiliser en *trans* pSET152. Ce plasmide porte les gènes de résistance à la kanamycine et à la tétracycline et a été utilisé pour la fabrication de la souche donneuse *E. coli* MRF'307.

II. Milieux de culture, solutions d'antibiotiques, conditions de croissance et de conservation

La composition des différents milieux (HT, YEME 34%, TSB, AS1, SOC, LB, milieu de production d'antibiotiques et milieu de croissance de *B. subtilis*), utilisés dans ce travail, est présentée dans les tableaux 4, 5 et 6. Ces milieux sont autoclavés pendant 20 minutes à 120°C. Après autoclavage, le milieu AS1 est complémenté en $MgCl_2$ 10 mM et NaOH 1 mM. Les solutions d'apramycine (30 mg/ml), de kanamycine (30 mg/ml), d'ampicilline (30 mg/ml) et d'acide nalidixique (50 mg/ml) sont réalisées dans de l'eau ultra pure et diluées au 1000ème ou au 2000ème (pour l'acide nalidixique) dans les différents milieux. La solution de tétracycline (30 mg/ml) est préparée dans de l'éthanol 70% (v/v) et est utilisée à la concentration de 30 µg/ml dans les milieux.

Le milieu HT convient pour la croissance et la sporulation de *S. ambofaciens*. Le milieu HT solide est utilisé pour l'observation du phénotype des colonies isolées ou pour la croissance en tapis confluent. L'extraction d'ADN génomique de *S. ambofaciens* est réalisée à partir de mycélium obtenu après croissance en milieu HT liquide 16 h à 30°C sous agitation (200 rpm) ou après croissance en milieu YEME liquide 36 h à 30°C et sous agitation (200 rpm). Le milieu LB est employé pour la croissance des différentes souches d'*E. coli*. Ce milieu est complémenté par un (ou plusieurs) antibiotique(s) nécessaire(s) ainsi que par du X-Gal (80 µg/ml) et de l'IPTG (48 µg/ml), utilisés pour la sélection des clones recombinants obtenus lors de la réalisation de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* dans *E. coli*. Les milieux TSB et AS1 sont utilisés pendant la conjugaison entre *E. coli* et *S. ambofaciens*. *S. ambofaciens* est cultivée en milieu liquide TSB à 30°C

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Souche	Phénotype	Origine	Référence
WT4	Pig^+	*S. ambofaciens* ATCC23877	Martin *et al.*, 1998
WT8	Pig^+	*S. ambofaciens* ATCC23877	Martin *et al.*, 1998
WT1p16	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT1	Martin *et al.*, 1998
WT4p12	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT4	Martin *et al.*, 1998
WT4p15	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT4	Martin *et al.*, 1998
WT4p21	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT4	Martin *et al.*, 1998
WT8p8	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT8	Martin *et al.*, 1998
WT8p25	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT8	Martin *et al.*, 1998
WT8p25(pSET152)	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT8p25	Ce travail
WT12p19	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT12	Martin *et al.*, 1998
WT12p28	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT12	Martin *et al.*, 1998
M4p30	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT4	Martin *et al.*, 1998
M12p31	Pig^-pap	*S. ambofaciens* WT12	Martin *et al.*, 1998
29C1	Pigvert	*S. ambofaciens* WT8p25	Ce travail
NSA205	Pig^+ ; Spi^-	*S. ambofaciens* RP181110	Dary *et al.*, 1992
RP181110	Pig^+ ; Spi^+	*S. ambofaciens* ATCC15154	Rhône-Poulenc

Tableau 2. Souches de *S. ambofaciens* utilisées au cours de ce travail.

Souche	Phénotype partiel	Référence
S17-1	Lac^+	(Mazodier *et al.*, 1989)
S17-1(pSET152)	Lac^+ $Apra^R$	Ce travail
ET12567(pUB307)	Lac^+ Kan^R Tet^R Nal^S	(Flett *et al.*, 1997)
XL1MRF'Blue	Lac^- Tet^R Nal^R	(Stratagène)
MRF'307	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S	Ce travail
MRF'307(pSET152)	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C1	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C2	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C3	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C4	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C5	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C6	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C7	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C8	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C9	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C10	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C11	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29C12	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D1	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D2	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D3	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D4	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D5	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D6	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D7	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D8	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D9	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D10	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D11	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail
29D12	Lac^- Tet^R Kan^R Nal^R Amp^S $Apra^R$	Ce travail

Tableau 3. Souches d'*E. coli* utilisées au cours de ce travail.

Composant du milieu	Milieu HT	Milieu YEME	Milieu TSB
Bacto Yeast Extract (DIFCO)	1 g	3 g	-
Beef Extract (DIFCO)	1 g	-	-
Malt Extract (DIFCO)	-	3 g	-
Bacto Peptone (DIFCO)	-	5 g	-
Dextrine Blanche (PROLABO)	10 g	-	-
NZ Amine type A (SHEFFIELD)	2 g	-	-
CoCl2, 7 H2O (PROLABO)	20 mg	-	-
D-Glucose (ACROS)	-	10 g	-
Saccharose (PROLABO)	-	340 g	-
Tryptic Soy Broth (DIFCO)	-	-	30 g
pH	7,2	7,2	-
Eau Ultra Pure qsp	1 l	1 l	1 l
Bacto Agar (DIFCO) (milieu solide)	20 g	-	-

Tableau 4. Composition des milieux HT (Hickey-Tresner) (Pridham *et al.*, 1956-1957), YEME (Yeast Extract Malt Extract) (Hopwood *et al.*, 1985) et TSB (Tryptic Soy Broth) (Baltz, 1978).

Composant du milieu	Milieu AS1	Milieu SOC	Milieu LB
Bacto Yeast Extract (DIFCO)	1 g	5 g	5 g
Bacto Tryptone (DIFCO)	-	20 g	10 g
NaCl (PROLABO)	2,5 g	0,58 g	5 g
KCl (ANALAR)	-	0,18 g	-
MgCl2 (LABOSI)	-	2,03 g	-
MgSO4 (PROLABO)	-	2,46 g	-
D-Glucose (ACROS)	-	3,60 g	-
L-alanine (ACROS)	0,2 g	-	-
L-arginine (SIGMA)	0,2 g	-	-
L-asparagine (SIGMA)	0,5 g	-	-
Na2SO4 (LABOSI)	10 g	-	-
Soluble Starch (LABOSI)	5 g	-	-
pH	-	-	7,2
Eau Ultra Pure qsp	1 l	1 l	1 l
Bacto Agar (DIFCO) (milieu solide)	20 g	-	-
Past Agar (DIFCO) (milieu solide)	-	-	20 g

Tableau 5. Composition des milieux AS1 (Baltz, 1980), SOC (Dower *et al.*, 1988) et LB (Luria-Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989).

Composant du milieu	Milieu de production d'antibiotiques	Milieu de croissance de *B.subtilis*
Bacto Yeast Extract (BIOKAR)	-	3 g
Beef Extract (BIOKAR)	-	3 g
D-Glucose (FLUKA)	-	8 g
Peptone Biotrypcase (BIOMERIEUX)	-	10 g
KH_2PO_4 (MERCK)	14 mM	100 mM
$MgSO_4$, 7 H_2O (MERCK)	1 g	-
$ZnSO_4$, 7 H_2O(PROLABO)	15 mg	-
NaCl (PROLABO)	20 g	-
$CoCl_2$, 6 H_2O (MERCK)	0,3 mg	-
Dextrine Blanche (PROLABO)	30 g	-
NH_4Cl (FLUKA)	37 mM	-
pH	7	7,3
Eau Ultra Pure qsp	1 l	1 l
Bacto Agar (BIOKAR)	-	8 g
$CaCO_3$ (MERCK)	5 g	

Tableau 6. Composition du milieu de production d'antibiotiques et du milieu de croissance de *B. subtilis* ATCC6633 (Schauner *et al.*, 1999).

sous agitation (200 rpm). Le mélange donneuse (*E. coli*) et receveuse (*S. ambofaciens*) est étalé sur milieu solide AS1. Le milieu de production d'antibiotiques est utilisé pour ensemencer les souches de *Streptomyces* en vue d'une extraction des lipides intracellulaires et des macrolides. Les cultures sont incubées à 28°C, sous agitation (250 rpm) pendant 120 h.

Les souches de *S. ambofaciens* sont conservées sous forme de sporée ou de suspension de mycélium à 4°C. Les spores et/ou le mycélium sont récupérés en grattant la surface de la boîte à l'aide d'une anse Pasteur et sont stockés dans de l'eau glycérolée (20%, v/v) qui joue le rôle de cryoprotecteur. Les souches d'*E. coli* sont conservées à –20°C dans de l'eau glycérolée (20%, v/v).

III. Test de sporulation

L'aptitude des souches de *S. ambofaciens* à sporuler est déterminée par observation au microscope photonique de fragments de colonies. La coloration de Gram consiste en une coloration préalable des fragments de colonie au violet de Gentiane suivie d'une addition de Lugol. Après rinçage de la préparation à l'eau et à l'éthanol 70% (v/v), celle-ci est colorée à la Fushine.

IV. Extraction d'ADN, digestion et électrophorèse

A. Extraction de l'ADN génomique de *S. ambofaciens*

L'ADN génomique est extrait d'un mycélium jeune obtenu après croissance en milieu HT à 30°C sous agitation (200 rpm) pendant 16 h. Le mycélium est récupéré par centrifugation, lavé avec 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) et repris de nouveau dans 500 µl de TE. Après addition de 20 µl de lysozyme (50 mg/ml) et incubation 30 min à 37°C, les protoplastes obtenus sont placés 10 min à 37°C en présence de 60 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8) pour inhiber les DNases et de 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) pour hydrolyser les protéines. La lyse des protoplastes et la libération du contenu cellulaire sont obtenues après addition de 60 µl de SDS 10% et incubation pendant 30 min à 50°C. Les protéines sont éliminées par précipitation à l'acétate de potassium, suivie d'une étape de phénolisation. Ainsi, après addition de 350 µl d'acétate de potassium (3M en potassium et 5M en acétate), une incubation de 10 min dans la glace est effectuée. Le culot protéique est éliminé par centrifugation, puis un volume de phénol équilibré en Tris-HCl pH 8 et un volume de chloroforme sont ajoutés au surnageant. Après centrifugation, un volume de chloroforme est ajouté à la phase aqueuse. Après centrifugation, l'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité par addition d'un volume d'isopropanol et le culot obtenu est lavé par ajout de 200 µl d'éthanol 70% (v/v), séché et dissout dans du TE. L'élimination des ARN est réalisée par addition d'un 10ème de volume de RNAse (10 mg/ml) et incubation 1 h à 37°C (Martin *et al.*, sous presse). La préparation de l'ADN génomique en vue d'une analyse par électrophorèse en champs pulsés (PFGE), est réalisée en matrice d'agarose (Low Melting Point Agarose, LMPA) selon la méthode décrite par Leblond *et al.* (1996).

B. Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli*

Après culture d'une nuit dans 3 ml de LB supplémenté ou non en antibiotique, environ 10^8 cellules sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans 100 µl de la solution I (Glucose

50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 et EDTA 10 mM pH 8). 200 µl de la solution II (NaOH 0,2N et SDS 1%) sont alors additionnés et le tout est placé 5 min dans la glace. Pour précipiter les protéines, 150 µl de la solution III (acétate de potassium : 3 M en potassium et 5 M en acétate) sont ajoutés suivi d'une incubation de 10 min dans la glace. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les ARN sont éliminés par addition d'un 10ème de volume d'une solution de RNAse (10 mg/ml) et incubation 1 h à 37°C. L'ADN plasmidique est ensuite précipité par addition d'un volume d'isopropanol, lavé dans de l'éthanol à 70% (v/v) et dissout dans du TE (Sambrook *et al.*, 1989).

C. Digestion de l'ADN

Les enzymes de restriction sont utilisées avec les tampons de digestion et aux températures recommandées par le fournisseur (Boehringer-Mannheim ou Biolabs New England). Pour la digestion d'environ 1 µg d'ADN génomique, 5 unités enzymatiques sont utilisées tandis que pour le PFGE, 20 unités enzymatiques sont nécessaires. Pour la digestion d'ADN plasmidique, 1 unité enzymatique par µg d'ADN à digérer est utilisée. Le temps d'incubation varie suivant qu'une digestion partielle ou totale de l'ADN est désirée.

D. Séparation des fragments de restriction

En électrophorèse classique, les fragments de restriction sont séparés après migration horizontale en gel d'agarose à 0,8%, pendant 14 h à 2 V/cm dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM). Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV (254 nm) après coloration du gel dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET à 0,5 µg/ml). L'ADN du phage lambda digéré par *Hin*dIII ou *Pst*I est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le PFGE est réalisé dans une cuve Bio-Rad de type CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) (Chu *et al.*, 1986) en utilisant comme tampon de migration le tampon TBE 0,5 X (Tris-borate 45 mM ; EDTA 1 mM).

V. Transfert d'ADN sur membrane

Le transfert d'ADN d'un gel d'agarose sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham pharmacia biotech) est effectué par capillarité ou sous vide en utilisant l'appareil Vacugene 2516 (Pharmacia LKB). Le transfert est réalisé par bain successif du gel dans 3 solutions : la solution de dépurination (HCl 0,25 M), la solution de dénaturation (NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M) et la solution de transfert (SSC 20X : NaCl 3 M ; Citrate de Na 0,3 M). Les 2 premières étapes durent 30 min et la dernière 1 h 30. Après rinçage de la membrane dans du SSC 2X, l'ADN est fixé à celle-ci par irradiation aux UV pendant 30 secondes.

VI. Marquage des sondes d'ADN, hybridation et révélation par bioluminescence

A. Marquage des sondes d'ADN

L'ADN utilisé comme sonde est marqué par incorporation de DIG-dUTP (déoxyUridine

Triphosphate couplée à la digoxygénine) selon la méthode des amorces aléatoires à l'aide du kit " DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive " (Boehringer Mannheim), dans les conditions recommandées par le constructeur. Le marquage de l'ADN peut aussi être réalisé dans de l'agarose à bas point de fusion (LMPA). Pour cela, 3 ml d'eau ultra pure pour 1 g de gel sont additionnés au fragment de gel contenant l'ADN à marquer et chauffés 10 min à 100°C. Le mélange réactionnel est ensuite effectué.

B. Hybridation et détection

L'hybridation débute par une incubation de la membrane 1 h à 68°C dans une solution de préhybridation (SSC 5X, SDS 0,02%, N-Lauroyl Sarcosine 0,1% et agent bloquant 1%). La membrane est alors incubée une nuit dans la solution d'hybridation (solution de préhybridation contenant la sonde marquée et dénaturée par chauffage 10 min à 100°C et refroidissement brutal à 4°C). La membrane est ensuite lavée 2 fois 15 min à température ambiante dans la solution de lavage 1 (SSC 2X et SDS 0,1%) et 2 fois 15 min à 68°C dans la solution de lavage 2 (SSC 0,5X et SDS 0,1%). La détection débute par une incubation de quelques minutes à température ambiante dans du tampon 1 (maléate 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 et Tween 20 0,3%) puis de 30 min à température ambiante dans du tampon 2 (même composition que le tampon 1, sans Tween 20, et contenant de l'agent bloquant à 1%). Ensuite, des anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline, dilués dans la solution précédente au 20000ème, sont alors ajoutés et incubés 30 min à température ambiante. Les anticorps fixés de façon aspécifique sont éliminés par 2 lavages successifs de la membrane, pendant 15 min, à température ambiante, dans du tampon 1. La membrane est placée ensuite dans du tampon de détection (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 et NaCl 100 mM). Le substrat lumigen CDP-Star est reconnu par la phosphatase alcaline et la détection des signaux d'hybridation est réalisée grâce au "système Fluor'Smax" (Bio-Rad).

VII. Conditions de ligation

Pour la réalisation de la banque du génome de *S. ambofaciens* chez *E. coli*, environ 600 ng d'ADN génomique du sous-clone sauvage WT8 partiellement digéré par *Bam*HI ont été mélangés à environ 120 ng d'ADN plasmidique de pSET152 digéré par la même enzyme. Le mélange a été réalisé dans un volume réactionnel de 48 µl de façon à obtenir une concentration en ADN de 15 µg/ml avec un rapport insert/vecteur de 5 (Hopwood *et al.*, 1985). La réaction de ligation a été réalisée par incubation du mélange une nuit à 4°C, après addition d'une unité de l'enzyme T4 DNA ligase pour 1 µg d'ADN à liguer .

VIII. Transformation d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) dans du milieu LB complémenté par les antibiotiques appropriés aux souches utilisées. A partir de cette préculture, une dilution au 100ème est réalisée dans du milieu LB et cette culture est incubée à 37°C jusqu'à obtenir une $DO_{600\ nm}$ comprise entre 0,5 et 1. Les étapes suivantes s'effectuent à 4°C. Après 2 centrifugations de 15 min à 5000 rpm à 4°C, le culot est repris à chaque fois dans un volume d'eau stérile. Puis, après une troisième centrifugation, le culot est cette fois resuspendu

dans un volume d'eau glycérolée (10%, v/v). Une dernière centrifugation permet de récupérer les cellules dans 0,002 volume d'eau glycérolée (10%). Les cellules sont utilisées immédiatement ou conservées à –70°C. L'ADN est mélangé à un aliquot de cellules et le tout est incubé une minute dans la glace. Après le choc électrique réalisé avec l'appareil Bio-Rad, les cellules sont reprises dans 1 ml de milieu liquide SOC et incubées pendant 1 h à 37°C sous agitation. Puis, les étalements sur milieu LB solide sont effectués (Dower *et al.*, 1988).

IX. Conjugaison entre souches d'*E. coli*

Le transfert du plasmide pUB307 a été réalisé par conjugaison entre la souche donneuse *E. coli* ET12567 (pUB307), résistante à la tétracycline et à la kanamycine et la souche receveuse *E coli* XL1MRF'Blue, résistante à la tétracycline et à l'acide nalidixique. Après culture des 2 souches en milieu liquide LB à 37°C pendant une nuit, les 2 souches ont été à nouveau cultivées en milieu LB liquide jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase exponentielle de croissance (environ 2 h 30 de croissance à 37°C sous agitation, 200 rpm). Les 2 souches ont alors été mélangées de manière à avoir un excès de receveuses et incubées 1 h 30 à 37°C sans agitation. Les exconjugants ont alors été sélectionnés par étalement du mélange sur milieu LB complémenté en tétracycline, kanamycine et en acide nalidixique (25µg/ml).

X. Conjugaison entre *E. coli* et *S. ambofaciens*

La souche donneuse d'*E. coli* est cultivée 12 h à 37°C dans du milieu LB liquide, complémenté en différents antibiotiques. *S. ambofaciens* est cultivée pendant 16 h à 30°C sous agitation (200 rpm) dans du milieu TSB. La culture est ensuite diluée au $10^{ème}$ dans du milieu TSB et incubée de 5 à 7 h à 30°C sous agitation (200 rpm). 100 µl de culture de la souche receveuse *S. ambofaciens* (environ 10^5 UFC) sont mélangés avec 50 µl de la culture de la souche donneuse *E. coli* (environ 10^7 UFC). Ces conditions permettent la présence d'un excès de cellules donneuses. Le mélange est étalé sur milieu AS1 solide. Après une nuit d'incubation à 30°C, les boîtes sont lavées avec du milieu LB liquide et légèrement grattées avec une pipette pour éliminer une partie des colonies d'*E. coli*, le mycélium de *S. ambofaciens* restant attaché à la gélose. La souche donneuse S17-1 ou MRF'307 est contre-sélectionnée par addition de 3 ml d'une solution contenant de l'acide nalidixique (50 µg/ml) et de l'apramycine (quand la donneuse est la souche S17-1) ou de l'ampicilline et de l'apramycine (quand la donneuse est la souche MRF'307) pour sélectionner les transconjugants. L'ampicilline est utilisée car la souche MRF'307 y est sensible alors que les *Streptomyces* y sont naturellement résistants (Hopwood *et al.*, 1985). Les boîtes sont placées pendant 10 jours à 30°C (Matsushima et Baltz, 1996).

XI. Extraction des lipides intracellulaires et des macrolides de *Streptomyces*

La matière sèche est récupérée, après 120 h de culture en milieu de production d'antibiotiques, par centrifugation, lavée avec de l'eau physiologique (NaCl 9‰, w/v) puis lyophilisée. Pour extraire les lipides totaux, 20 ml du solvant appelé mélange de Folch

(chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v)) sont additionnés à la matière sèche et après incubation de 30 min à température ambiante, une filtration est réalisée (Folch *et al.*, 1957). Cette étape est répétée 2 fois. Pour séparer la phase chloroformique contenant les lipides de la phase méthanolique, du KCl 9 ‰ (w/v) est ajouté dans les proportions suivantes : chloroforme/méthanol/KCl (8/4/3 ; v/v/v). L'extrait lipidique est récupéré à partir de la phase chloroformique, après évaporation sous vide à 40°C. Cet extrait est pesé et repris dans 1 ml de chloroforme. Après avoir ajusté le pH du surnageant à 9 avec du NH_4OH concentré, les macrolides en sont extraits par 2 traitements successifs du surnageant avec de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est éliminée et la phase organique est concentrée par évaporation sous vide. L'extrait est repris dans 400 µl d'acétate d'éthyle.

XII. Analyse des composés lipidiques en Chromatographie en Couche Mince (CCM)

La CCM est réalisée sur plaque de silice G60 (Merck 5721). La migration a lieu pendant 1 h 30 en utilisant un solvant de migration apolaire)chloroforme/éthanol/acétate d'éthyle (85/15/1 ; v/v/v)). Après séchage de la plaque, les composés sont visualisés après vaporisation d'acide perchlorique 40 % (v/v), colorant non spécifique, et chauffage de la plaque à 100°C pendant 15 min.

XIII. Test de l'activité antibiotique

Certains antibiotiques comme la spiramycine excrétés dans le milieu de culture peuvent être mis en évidence en utilisant la souche cible *Bacillus subtilis* ATCC6633. 60 µl de surnageant sont déposés sur un disque de papier, alors placé sur une gélose ensemencée avec 10^8 spores/ml de *B. subtilis* ATCC6633. Après diffusion une nuit à 4°C, les boîtes sont incubées à 37°C pendant environ 8 h. Un halo d'inhibition de croissance de cette bactérie est observé si le milieu de culture contient un composé à activité antibiotique. Pour déterminer si un composé séparé après chromatographie présente une activité antibiotique, ce test peut être réalisé en déposant une plaque CCM non colorée sur une gélose ensemencée par *B. subtilis* ATCC6633, pendant 4 h à 4°C. Les zones d'inhibition de croissance de *B. subtilis* sont révélées après incubation de cette plaque de gélose à 37°C pendant 8 h environ.

XIV. Analyses statistiques

Les fréquences sont accompagnées de la valeur de l'intervalle de confiance pour un coefficient de sécurité de 95 %.

L'estimation du nombre de clones recombinants nécessaires pour que la banque soit représentative est effectuée à l'aide de la formule de Clarke et Carbon : $N = \ln(1-P)/\ln(1-I/G)$ où N est le nombre de clones à repiquer, P la probabilité de recouvrir l'ensemble du génome, I la taille moyenne des inserts et G la taille du génome (8000 kb).

RESULTATS

I. Sélection d'un hôte potentiel de clonage parmi des mutants Pig⁻pap

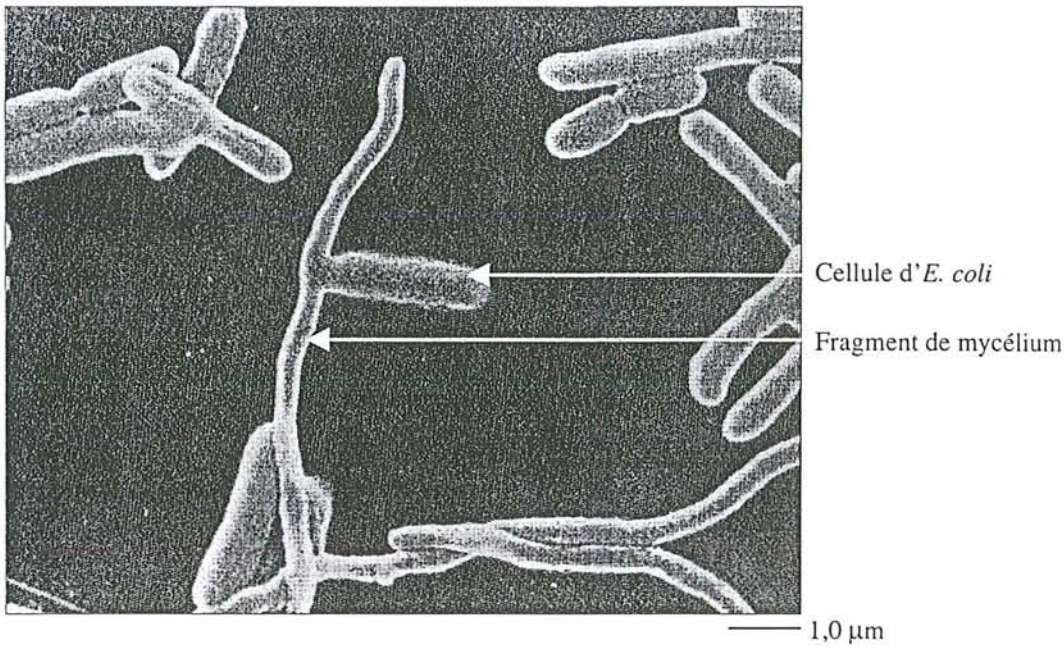
La nature du(des) gène(s) cible(s) de l'état mutateur, muté(s) à haute fréquence chez les mutants Pig⁻pap, étant inconnue, la caractérisation de ce(s) gène(s) nécessite un clonage par complémentation chez une souche mutante Pig⁻pap. Il est à souligner que cette stratégie implique que l'allèle mutant soit récessif. Le mutant Pig⁻pap utilisé pour ce clonage doit présenter certaines propriétés. Le phénotype mutant Pig⁻pap ne doit pas réverter à haute fréquence vers le phénotype sauvage, ce mutant ne doit pas présenter une instabilité génomique importante et il doit être possible d'y introduire de l'ADN recombinant. Par ailleurs, des gènes intervenant dans la différenciation ayant été identifiés chez *S. coelicolor*, l'absence de réarrangement au niveau de ces gènes peut être vérifiée.

L'introduction d'ADN recombinant chez *Streptomyces* peut être réalisée par au moins 3 méthodes : la transformation de protoplastes, l'infection par des phages recombinants et la conjugaison. La protoplastisation étant un traitement connu pour induire l'instabilité génétique, la transformation n'est pas envisageable (Hütter et Eckhardt, 1988). Les vecteurs phagiques développés pour *Streptomyces* et dont nous disposons au laboratoire sont des dérivés du phage ØC31 de *S. coelicolor*. L'infection de mutants Pig⁻pap par un de ces phages n'a pas été efficace (P. Martin, comm. pers.). Ceci est probablement dû à l'absence de sporulation des mutants Pig⁻pap. En effet, l'infection de *Streptomyces* par le phage ØC31 a lieu dès le début de la germination des spores (Hopwood *et al.*, 1985). Un fragment de mycélium en croissance constitue probablement un moins bon substrat pour l'infection. La conjugaison peut être réalisée par croisement entre 2 souches de *Streptomyces* ou par croisement entre *E. coli* et *Streptomyces*. L'utilisation de la conjugaison entre *Streptomyces* nécessite des souches possédant des marqueurs génétiques différents afin d'éliminer les souches parentales et de ne sélectionner que les exconjugants. La conjugaison intergénérique entre *E. coli* et *Streptomyces* (figure 9) présente l'avantage de la construction d'une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* ATCC23877 dans la bactérie hôte *E. coli*, bactérie très employée en génétique moléculaire même si des risques de réarrangements des inserts sont toujours possibles. Parmi les vecteurs décrits, nous avons choisi d'utiliser le plasmide pSET152 qui se réplique chez *E. coli* mais pas chez *Streptomyces*. Chez *Streptomyces*, ce vecteur, porteur du gène de résistance à l'apramycine, s'intègre au niveau du site *attB* du phage ØC31, présent dans le génome de *S. ambofaciens*. Cette intégration est rendue possible grâce à la présence sur le plasmide du gène codant l'intégrase et du site *attP* du phage ØC31. Le transfert par conjugaison d'*E. coli* à *S. ambofaciens* se fait à partir d'une origine de transfert *oriT* de 760 pb (figure 8). Les fonctions nécessaires au transfert sont apportées par la souche donneuse *E. coli*.

A. Absence de délétion dans des homologues de gènes *whi* de *S. coelicolor* chez plusieurs mutants Pig⁻pap

Afin de s'assurer que le phénotype Pig⁻pap ne résultait pas d'une délétion dans des gènes

A.



B.

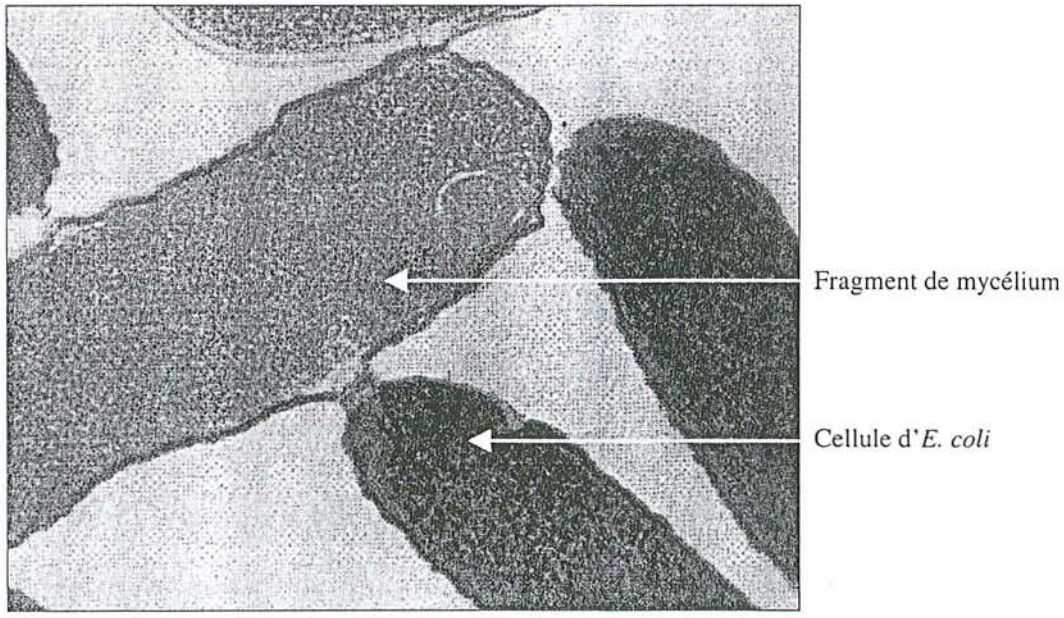


Figure 9. Conjugaison entre *E. coli* S17-1 et *S. lividans* 1326. **A.** En microscopie électronique à balayage. **B.** En microscopie électronique à transmission (Giebelhaus *et al.*, 1996).

de différenciation déjà connus, des profils de restriction *Bam*HI de 8 mutants Pig$^-_{pap}$ d'origine différente, choisis aléatoirement (WT4p12, WT4p21, WT1p16, WT8p8, WT8p25, WT12p29, M4p30 et M12p31) et du sous-clone sauvage WT4 ont été hybridés avec les plasmides pIJ6204, pIJ2157, pIJ2156, pIJ6301, pIJ6201 et pIJ6205 qui contiennent respectivement les gènes *whiA*, *whiB*, *whiE*, *whiG*, *whiH* et *whiJ* (fournis par Pr. K. Chater). Pour chacune des sondes utilisées, les différentes souches testées présentaient le même profil d'hybridation (figure 10). Ces résultats montrent que des gènes homologues aux gènes *whi* existent dans le génome de *S. ambofaciens* et que le phénotype Pig$^-_{pap}$ ne résulte pas d'une délétion détectable d'un de ces homologues chez les mutants testés.

B. Etude de l'instabilité génétique et génomique de quelques mutants Pig$^-_{pap}$

1. Estimation du taux de réversion chez 5 mutants Pig$^-_{pap}$

Le taux de réversion du phénotype Pig$^-_{pap}$ vers le phénotype sauvage pigmenté a été estimé dans la descendance de 5 mutants Pig$^-_{pap}$ (WT1p16, WT4p15, WT8p8, WT8p25 et WT12p28). Dans ce but, les souches ayant été conservées sous forme de suspension de mycélium à -20°C, ont été cultivées sur milieu HT, 7 jours à 30°C. Pour chacune des souches, une colonie présentant un phénotype Pig$^-_{pap}$ a été choisie puis utilisée pour constituer une nouvelle suspension de mycélium après culture en tapis confluent. Chaque suspension de mycélium a alors été récupérée comme indiqué dans la section "Matériels et Méthodes", titrée et le taux de réversion a été déterminé. Chaque souche a été ensemencée sur milieu HT solide à raison d'environ 500 colonies par boîte et cultivée 7 jours à 30°C. Dans ces conditions, la souche sauvage pigmente à partir du quatrième jour. Les colonies ont été dénombrées sur un échantillon de boîtes sélectionnées aléatoirement. Comme cela est présenté dans le tableau 7, aucun révertant n'a été détecté pour chacune des 5 souches testées. Ainsi, le taux de réversion spontané vers le phénotype sauvage étant inférieur à 2.10^{-5}, le phénotype mutant apparaissait donc suffisamment stable pour envisager un clonage par complémentation chez un mutant Pig$^-_{pap}$. Les souches mutantes WT8p8 et WT8p25 ont été choisies pour les expériences suivantes car elles ne présentent pas de délétion détectable dans les homologues des gènes *whi* et proviennent du sous-clone sauvage WT8 à l'origine de nombreux mutants caractérisés (Martin *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 1999).

2. Etude de l'instabilité génétique et génomique des souches WT8p8 et WT8p25

Afin d'étudier leur instabilité génétique et génomique, les souches WT8p8 et WT8p25 ont été cultivées sur milieu HT à 30°C à raison d'environ 20 colonies par boîte pendant 14 jours. Ce temps d'incubation correspond à celui utilisé habituellement pour décrire les phénotypes (Martin *et al.*, 1998). Dans chacune des descendances, le phénotype Pig$^-_{pap}$ qui se caractérise par la formation d'un abondant mycélium blanc (figure 11A) était majoritaire (tableau 8). Néanmoins, des colonies de phénotype différent du phénotype parental ont été observées. Certaines étaient plus ou moins déficientes pour la production de mycélium aérien (phénotype Amy+/-, figure 11B). D'autres présentaient un mycélium légèrement pigmenté, phénotype Pig$_{def}$. Bien que la production de pigment soit détectable, ces colonies ne présentaient pas un phénotype sauvage.

Plusieurs colonies de chaque phénotype ont été sous-clonées plusieurs fois sur milieu HT

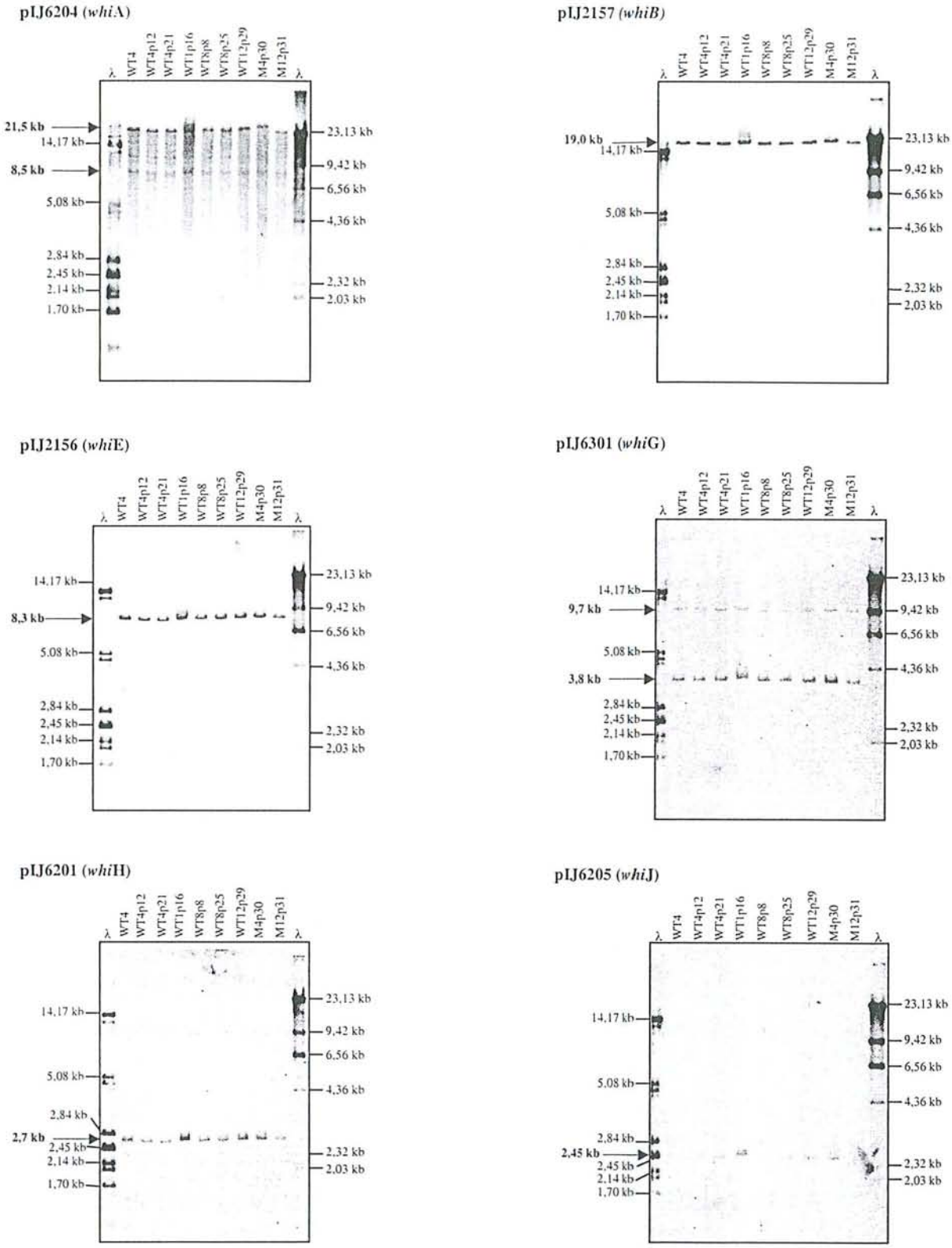


Figure 10. Hybridation des plasmides porteurs des différents gènes *whi* de *S. coelicolor* sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de plusieurs souches de *S. ambofaciens*. Le nom de ces souches est indiqué sur les figures. Pour chaque profil, l'ADN du phage λ digéré par *Pst*I (à gauche) et par *Hin*dIII (à droite) a servi de marqueur de poids moléculaire.

Mutant $Pig^{-}pap$	Nombre de boîtes étalées	Nombre moyen de colonies par boîte	Intervalle de confiance	Nombre de révertant sur nombre moyen de colonies observées	Taux de réversion estimé
WT1p16	124	353	105	0/43772	$<2.10^{-5}$
WT4p15	120	523	152	0/62760	$<2.10^{-5}$
WT8p8	125	1014	258	0/126750	$<7.10^{-6}$
WT8p25	140	404	152	0/56630	$<2.10^{-5}$
WT12p28	116	516	317	0/59856	$<2.10^{-5}$

Tableau 7. Estimation du taux de réversion vers le phénotype sauvage de 5 mutants $Pig^{-}pap$: WT1p16, WT4p15, WT8p8, WT8p25 et WT12p28. L'intervalle de confiance a été calculé avec un risque $\alpha = 0,05$.

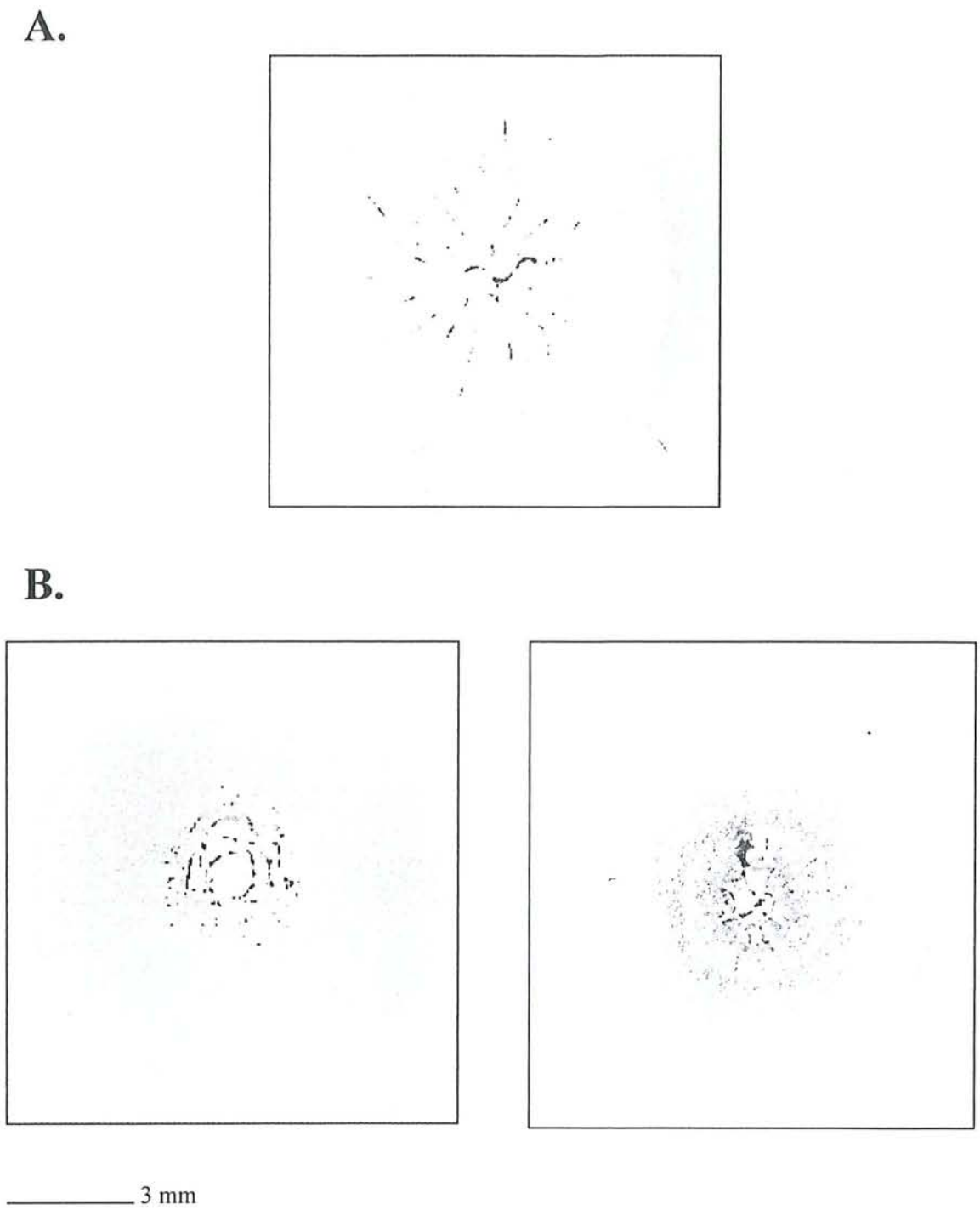


Figure 11. Différents phénotypes de colonies observées dans la descendance du mutant Pig^{-}_{pap} WT8p25. **A.** Colonie de phénotype Pig^{-}_{pap}. **B.** Colonies de phénotype [Amy+/-].

Mutant Pig^{-}_{pap}	WT8p8	WT8p25
[Amy +/-]	28	12
[Pig_{def}]	3	0
Nombre de colonies observées	2114	375
Fréquence d'instabilité phénotypique (‰)	1,4	3,2
Intervalle de confiance (‰)	0,5	1,8

Tableau 8. Fréquence de colonies présentant un phénotype différent du phénotype parental Pig^{-}_{pap} dans la descendance de WT8p8 et WT8p25. Le nombre de colonies observées ainsi que le nombre de colonies de phénotype Amy +/- ou Pig_{def} est indiqué. Le reste des colonies observées est de phénotype Pig^{-}_{pap}. L'intervalle de confiance indiqué a été calculé au risque $\alpha = 0,05$.

jusqu'à l'obtention d'une descendance homogène de même phénotype que la colonie initialement sélectionnée. L'obtention de clones de même phénotype que ceux initialement observés montre qu'ils ne correspondaient pas à des phénocopies. Les profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de ces clones ont été hybridés avec les cosmides recombinants D9 et A85 (Fischer *et al.*, 1997b ; Leblond *et al.*, 1996). Ces 2 cosmides permettent de révéler les régions les plus fréquemment délétées chez *S. ambofaciens* ATCC23877, dont est issu le sous-clone sauvage WT8. En effet, chez les mutants issus de WT8 ou d'autres sous-clones sauvages, les délétions affectent soit les 2 extrémités chromosomiques, soit l'extrémité chromosomique droite. Lorsque les 2 extrémités chromosomiques sont affectées, les régions homologues à D9, localisées dans les TIR, sont délétées. Quand seule l'extrémité chromosomique droite est affectée, la région A85 est la plus fréquemment délétée (Martin *et al.*, 1999). L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans la figure 12. Deux sous-clones délétés pour la région A85 ont été observés parmi les 17 sous-clones issus de WT8p8. De la même manière, 1 sous-clone délété pour la région révélée par A85 et 1 sous-clone délété pour les régions révélées par A85 et D9 ont été obtenus parmi les 18 sous-clones issus de WT8p25. Pour chaque souche, les délétions n'ont été détectées que dans les sous-clones de phénotype Amy+/-. Par contre, tous les sous-clones de phénotype Pig^{-}_{pap} analysés ne présentaient pas de délétion dans les régions testées.

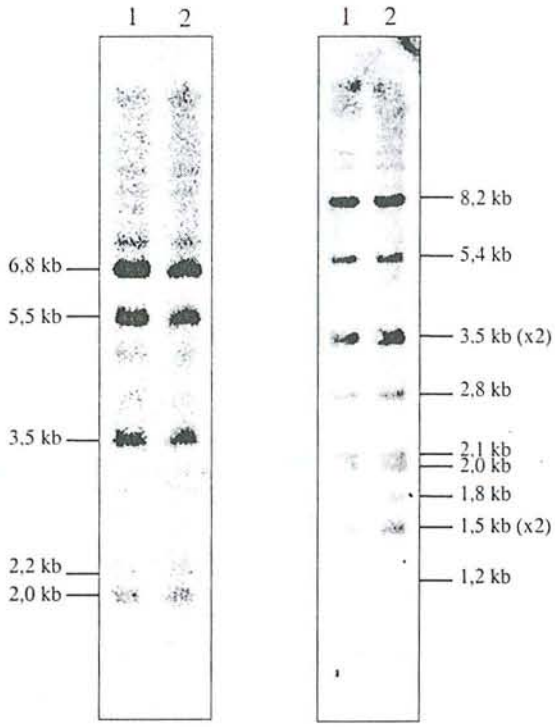
Le sous-clone sauvage WT8 produit des mutants Pig^{-}_{col} à une fréquence de 1,2% dont 60% sont délétés. Cela implique que WT8 produit environ 0,7% de mutants Pig^{-}_{col} délétés. En appliquant le même raisonnement, il a été observé que WT8p8 et WT8p25 produisaient des mutants délétés à une fréquence similaire à celle de la souche sauvage WT8 dont elles dérivent (0,4% et 0,9% respectivement). Ainsi, les 2 souches mutantes WT8p8 et WT8p25 présentent une instabilité génomique similaire à celle du sauvage et peuvent donc être utilisées pour le clonage.

C. Détermination de l'aptitude de deux mutants Pig^{-}_{pap} à conjuguer

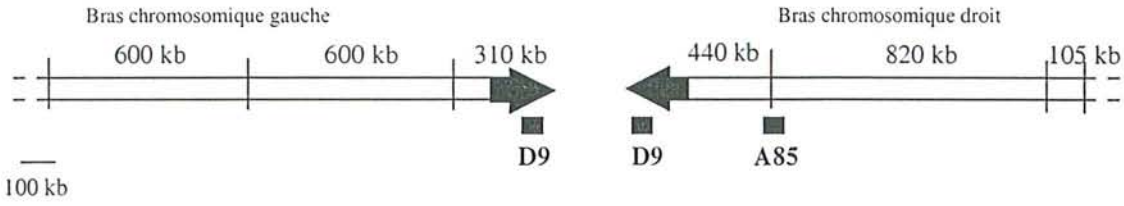
La capacité des souches WT8p8 et WT8p25 à conjuguer avec *E. coli* a été testée. Pour ces essais de conjugaison, la souche *E. coli* S17-1, habituellement utilisée pour les conjugaisons intergénériques *E. coli-Streptomyces*, a été choisie. Cette souche porte les fonctions nécessaires au transfert du plasmide pSET152. Avant de réaliser la conjugaison, la souche S17-1 a été transformée avec pSET152. La souche S17-1(pSET152) a été sélectionnée sur milieu LB solide complémenté en apramycine. Deux essais indépendants de conjugaison ont alors été réalisés avec les souches WT8p8, WT8p25 et WT8. Les conjugaisons ont été effectuées sur milieu AS1 en excès de donneuses (de l'ordre de 10 donneuses pour 1 receveuse). La souche donneuse S17-1(pSET152) a été éliminée par addition d'acide nalidixique (50 µg/ml) et la souche receveuse par addition d'apramycine. Avant conjugaison, les souches receveuses ont été étalées à raison d'environ 10^6 UFC par boîte, sur milieu AS1 complémenté en apramycine et acide nalidixique (50 µg/ml) et aucun résistant spontané aux 2 antibiotiques n'a été observé pour chacune de ces souches.

Des colonies résistantes à l'apramycine ont été obtenues après conjugaison. La présence de pSET152 a été vérifiée par hybridation de ce plasmide avec des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de 6 colonies issues des croisements. Le plasmide ne comportant qu'un site *Bam*HI, 2 fragments résultant de son intégration étaient attendus (figure 13). Des fragments de 11,0 kb et de 6,0 kb ont été observés à chaque fois, attestant de la présence du plasmide pSET152

A.



B.



C.

		Nombre de clones analysés	Sonde D9	Sonde A85
WT8p8	**Pig$^-_{pap}$**	6	+	+
	Amy+/-	5	+	+
		2	+	-
	Pig$_{def}$	3	+	+
WT8p25	**Pig$^-_{pap}$**	10	+	+
	Amy+/-	6	+	+
		1	+	-
		1	-	-

Figure 12. Analyse génomique de clones issus des souches de *S. ambofaciens* WT8p8 et WT8p25. **A.** Profils d'hybridation obtenus avec les cosmides recombinants D9 (à gauche) et A85 (à droite) sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de la souche sauvage WT8 (piste 1) et d'un mutant de phénotype Pig$^-_{pap}$ issus de la souche WT8p25 (piste 2). **B.** Localisation des cosmides D9 et A85 sur la carte de restriction *Ase*I des extrémités du chromosome sauvage de *S. ambofaciens*. **C.** Nombre de clones issus des souches WT8p8 et WT8p25 présentant (+) ou non (-) la région révélée par les cosmides D9 et A85.

intégré dans le génome des transconjugants. Enfin, la fréquence de transconjugants obtenue pour chaque souche était similaire (tableau 9).

D. Choix de la souche WT8p25 comme hôte de clonage

Ainsi, la conjugaison intergénérique *E. coli* et *S. ambofaciens* peut être utilisée pour introduire de l'ADN recombinant dans les mutants Pig^{-}_{pap} dans le but d'un clonage par complémentation. Nous avons donc choisi de construire une banque d'ADN génomique chez *E. coli* en utilisant comme vecteur pSET152 et d'introduire des vecteurs recombinants chez *S. ambofaciens* WT8p25 par conjugaison. Cette souche a été choisie car elle ne possède pas de délétion détectable, est capable de conjuguer, a un taux de réversion vers le phénotype sauvage inférieur à 2.10^{-5} et ne produit pas de mutants délétés à haute fréquence. De plus, dans la descendance de la souche WT8p25, aucune colonie légèrement pigmentée n'a été observée alors que c'était le cas dans la descendance de la souche WT8p8.

II. Construction d'une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* et criblage partiel

A. Fabrication de la souche donneuse *E. coli* MRF'307

La construction de la banque d'ADN génomique chez *E. coli* nécessitait l'utilisation d'un marqueur permettant d'identifier les clones recombinants. Le plasmide pSET152 possède un MCS (Multi Cloning Site) situé dans le gène *lacZα*. Ce plasmide, introduit dans une souche Lac^{-} (possédant l'allèle *lacZΔM15* codant une β–galactosidase défective), restaure le phénotype Lac^{+} par α-complémentation. Les 2 souches donneuses *E. coli* S17-1 et ET12567(pUB307), dont nous disposons au laboratoire, étant Lac^{+}, la souche XL1MRF'Blue de phénotype Lac^{-} a donc été choisie. Comme cette souche ne comportait pas les fonctions nécessaires à la mobilisation de pSET152, nous avons introduit par conjugaison le plasmide pUB307 qui les porte. La stratégie utilisée est résumée dans la figure 14. Le plasmide pUB307 est présent dans la souche *E. coli* ET12567(pUB307) à laquelle il confère la résistance à la kanamycine et à la tétracycline. La souche XL1MRF'Blue, quant à elle, est résistante à la tétracycline et à l'acide nalidixique car porteuse de l'allèle *gyrA96*. Afin de disposer d'un milieu permettant l'élimination des souches parentales et la sélection des exconjugants, nous avons testé la sensibilité de la souche ET12567(pUB307) à l'acide nalidixique et la sensibilité de la souche XL1MRF'Blue à la kanamycine. Comme indiqué dans le tableau 10, la souche XL1MRF'Blue est sensible à la kanamycine et à une concentration d'acide nalidixique de 50 µg/ml. La souche ET12567(PUB307) est sensible à une concentration d'acide nalidixique de 25µg/ml. Ainsi, les souches parentales pouvaient être éliminées après conjugaison sur un milieu contenant de la tétracycline, de la kanamycine et de l'acide nalidixique à une concentration de 25µg/ml (tableau 10). La conjugaison a été réalisée en milieu LB liquide sans agitation pendant 1 h 30 à 37°C. Dans cette expérience, le mélange des 2 souches parentales a été effectué de manière à avoir un rapport receveuse/donneuse égal à 6. Un des exconjugants ainsi obtenus a été cultivé en milieu LB liquide complémenté en tétracycline et kanamycine, ce qui a permis l'obtention de la souche *E. coli* MRF'307 (figure 14).

Souche receveuse	Essai de conjugaison	Titre de la receveuse (UFC/ml)	Rapport : Donneuse / Receveuse	Nombre de transconjugants par boîte	Nombre de transconjugants pour 100 UFC de receveuses
WT8	1	10^7	15	819	0,08
	2	10^6	5	666	0,06
WT8p8	1	4.10^6	38	242	0,06
	2	3.10^5	17	378	1,3
WT8p25	1	5.10^5	30	768	0,15
	2	6.10^5	8	532	0,9

Tableau 9. Fréquence de transconjugants obtenus après conjugaison entre la souche donneuse *E. coli* S17-1(pSET152) et les souches receveuses *S. ambofaciens* WT8, WT8p8 et WT8p25. Pour le premier essai, le titre de la souche donneuse S17-1(pSET152) était de 3.10^8 UFC/ml. Pour le deuxième essai, le titre de S17-1(pSET152) était de 10^7 UFC/ml. Ces titres ont été déterminés sur milieu LB solide après étalement de différentes dilutions de la culture de la souche donneuse et pour la souche receveuse sur milieu AS1. Aucune colonie n'a été observée sur milieu AS1 complémenté en apramycine et en acide nalidixique (50 µg/ml), après étalement des receveuses.

Antibiotique (µg/ml)	XL1MRF'Blue	ET12567(pUB307)
Tétracycline (30)	+	+
Acide nalidixique (25)	+	-
Acide nalidixique (50)	-	-
Kanamycine (30)	-	+
Tétracycline (30) Acide nalidixique (25) Kanamycine (30)	-	-

Tableau 10. Aptitude des souches *E. coli* XL1MRF'Blue et *E. coli* ET12567(pUB307) à croître sur milieu solide LB complémenté en différents antibiotiques. Pour les 2 souches, un témoin a été réalisé sur milieu LB sans antibiotique. Pour tous les essais, les souches ont été ensemencées à raison de plus de 10^6 UFC par boîte et cultivées une nuit à 37°C. Le signe + correspond à la croissance de la souche, le signe - signifie qu'aucune croissance n'a été observée. L'absence de croissance de la souche XL1MRF'Blue sur milieu LB contenant de l'acide nalidixique (50 µg/ml) montre que l'allèle *gyrA96* ne confère pas ce niveau de résistance à la souche qui le porte.

La capacité de cette nouvelle souche à mobiliser pSET152 lors d'un croisement *E. coli-Streptomyces* a été testée. La souche MRF'307 a été transformée avec pSET152 et la souche MRF'307(pSET152) a été sélectionnée sur milieu LB solide complémenté en apramycine, kanamycine et tétracycline. La souche sauvage WT8 et la souche mutante WT8p25 ont été croisées avec la souche S17-1(pSET152) d'une part et la souche MRF'307(pSET152) d'autre part. Le nombre de transconjugants obtenus pour les 4 croisements étant supérieur à 1000 colonies par boîte, une fréquence de transconjugants pour 100 receveuses n'a pu être déterminée avec précision. Néanmoins, d'un point de vue qualitatif, aucune différence notable n'ayant été constatée, il a été conclu que la souche MRF'307(pSET152) pouvait assurer la conjugaison avec *S. ambofaciens* WT8p25. Ainsi, cette souche d'*E. coli* a été utilisée pour la suite du travail.

B. Réalisation de la banque d'ADN génomique de WT8 chez *E. coli* MRF'307

La banque d'ADN génomique du sous-clone sauvage WT8 dans pSET152 a été réalisée chez *E. coli* MRF'307. Pour cela, l'ADN génomique de WT8 a été digéré partiellement par l'enzyme de restriction *Bam*HI et ligué avec le plasmide pSET152 linéarisé par digestion par la même enzyme. Le site *Bam*HI est présent dans le gène *lacZα* (figure 8). La ligation a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et le mélange a été utilisé pour transformer la souche MRF'307. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB solide supplémenté en tétracycline, kanamycine, apramycine, X-Gal et IPTG. Après une nuit d'incubation à 37°C, environ 90% des colonies obtenues étaient blanches. Afin de vérifier la présence de plasmides recombinants, l'ADN plasmidique de 73 clones blancs a été extrait et digéré par *Bam*HI. Environ 80% des clones blancs étaient recombinants (figure 15). Par ailleurs, 20% de ces clones recombinants présentaient au moins un site *Bam*HI dans l'insert, ce qui montre que la digestion de l'ADN génomique de WT8 était bien partielle. La taille des inserts varie de 1,6 à 30 kb avec une taille moyenne estimée à 8 kb. 7400 clones blancs ont été repiqués. La probabilité pour que tout le génome de *S. ambofaciens* WT8 soit représenté au moins une fois est de 0,997. Chaque clone de la banque a été ensemencé sur milieu LB solide et dans 100 µl de milieu LB liquide complémenté en tétracycline, kanamycine et apramycine pour la conservation des différents clones de la banque, puis cultivé à 37°C une nuit.

C. Criblage d'une partie de la banque d'ADN génomique par conjugaison intergénérique *E. coli* et *S. ambofaciens* WT8p25

La banque comportant 7400 clones, un criblage par croisement entre une seule donneuse et la receveuse WT8p25 n'était pas envisageable. Afin d'augmenter l'efficacité de criblage il est donc apparu nécessaire de grouper les souches donneuses. Sachant qu'environ 300 transconjugants par croisement avaient été obtenus avec la souche donneuse *E. coli* S17-1 (tableau 9), l'utilisation de plusieurs donneuses par croisement était *a priori* envisageable. En effet, si 300 transconjugants étaient obtenus après croisement entre 50 donneuses et la receveuse WT8p25, cela impliquait que chaque plasmide était en moyenne représenté 6 fois. Ceci bien évidemment, dans l'hypothèse où tous les plasmides sont transférés. Le même raisonnement a été tenu avec un regroupement de 25 donneuses.

Lors des croisements effectués précédemment, la souche donneuse était cultivée en tube contenant 3 ml de milieu complet sous agitation (200 rpm). Ce type de culture était inadapté à la

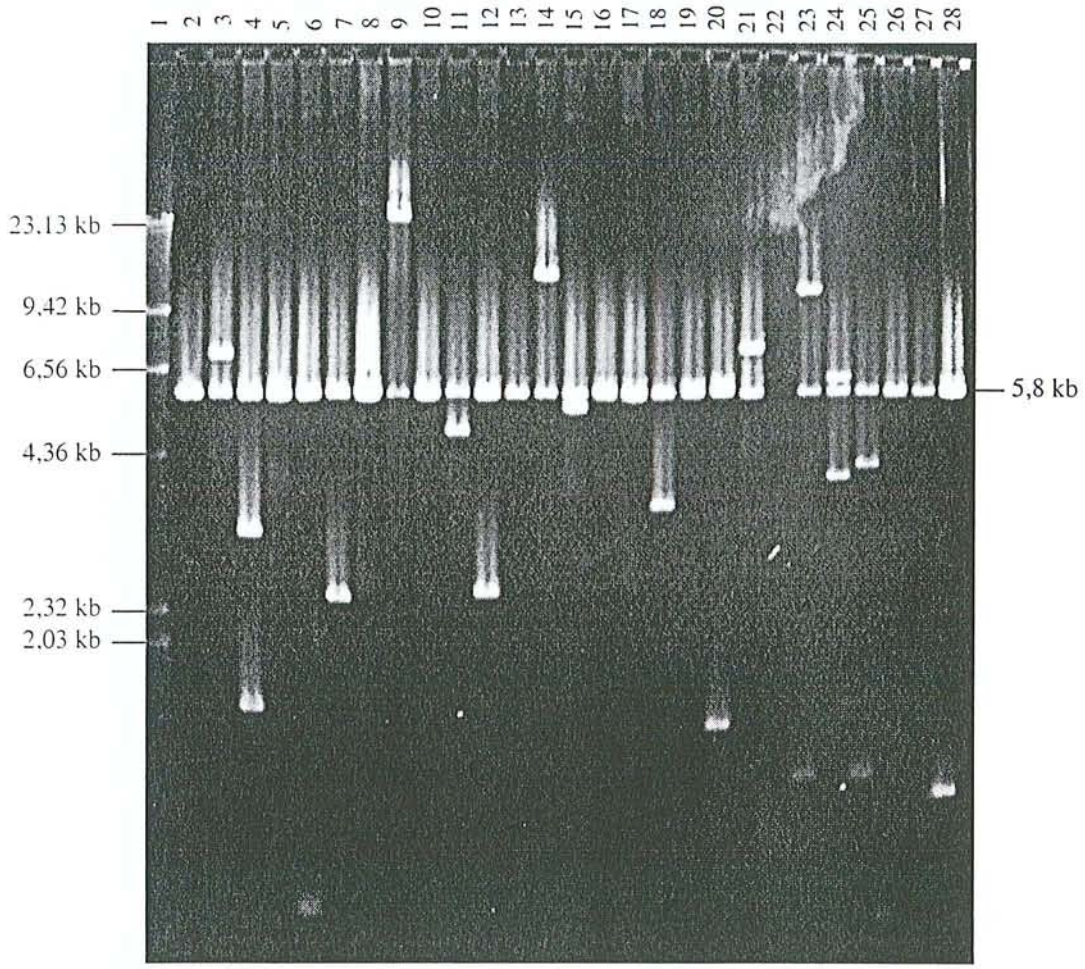


Figure 15. Profils de restriction *Bam*HI de l'ADN plasmidique de 27 clones blancs (pistes 2 à 28). La piste 1 correspond au profil de restriction *Hin*dIII de l'ADN du bactériophage λ. La bande à 5,8 kb correspond à pSET152 et les autres bandes observées à l'insert.

culture d'un très grand nombre de souches donneuses (plusieurs centaines à chaque fois). De ce point de vue, la culture d'un grand nombre de souches donneuses apparaissait plus aisée en plaque de microtitration, c'est à dire dans un volume de 100 µl de milieu complet sans agitation. Néanmoins, ces 2 conditions de culture pouvaient avoir un effet sur l'efficacité de conjugaison.

Ainsi, comme cela est résumé sur la figure 16, nous avons déterminé le nombre de transconjugants, obtenus lors de croisements impliquant 25 et 50 donneuses ayant été cultivées soit en tubes sous agitation, soit en cupules sans agitation. Après conjugaison avec les mélanges de 25 et 50 donneuses, il a été constaté que le nombre de transconjugants obtenus en ensemençant les donneuses en cupules était un peu plus faible que le nombre obtenu en les ensemençant en tubes (tableau 11). Cependant, pour les raisons pratiques énoncées précédemment, nous avons choisi d'ensemencer les donneuses en cupule. Si chaque transconjugant est issu de l'intégration d'un plasmide conjugatif, alors parmi les 66 transconjugants obtenus avec le mélange de 25 donneuses, les plasmides seraient représentés 2 à 3 fois, alors qu'avec le mélange de 50 donneuses, dans les 52 transconjugants obtenus, chaque plasmide ne serait représenté qu'une seule fois. Donc, pour que tous les plasmides du mélange aient des chances d'être représenté au moins 1 fois, il est apparu préférable de réaliser des croisements avec un mélange d'au plus 25 donneuses.

Le criblage de la banque d'ADN génomique a été réalisé par conjugaison entre le mutant $Pig^{-}pap$ WT8p25 et différents mélanges de 24 donneuses, ce qui correspond exactement à 4 mélanges par plaque de microtitration. 132 croisements ont été réalisés, soit 3168 clones testés. Après conjugaison, les transconjugants sélectionnés sur milieu AS1 par l'apramycine et l'ampicilline ont été dénombrés pour chaque mélange. Les résultats sont présentés dans la figure 17. Dans 40% environ des mélanges testés, le nombre de transconjugants était inférieur à 25. Ainsi, si un transconjugant est le résultat du transfert d'un plasmide, tous les plasmides ne sont pas représentés. En ne considérant que les croisements où plus de 25 transconjugants ont été observés, près de 1800 clones ont été testés jusqu'à présent, soit environ 25% de la banque.

Les transconjugants obtenus sur milieu AS1, après 10 jours de croissance, ont été récupérés dans de l'eau glycérolée (20%). 100 µl de chaque suspension ont été étalés sur milieu HT complémenté en apramycine et ampicilline. Les phénotypes ont été observés après 14 jours de croissance à 30°C. Sur milieu HT contenant de l'ampicilline, la souche sauvage pigmente à partir du quatrième voire du cinquième jour de croissance. Parmi les transconjugants obtenus, avec le mélange nommé 29.2, une colonie de phénotype $Pig^{-}pap$ avec un secteur pigmenté vert a été observée. Ce secteur a été repiqué sur milieu HT complémenté en apramycine et ampicilline et un clone pigmenté vert a été sélectionné (figure 18). Après plusieurs sous-clonage, pour avoir une population homogène, la souche 29C1 a été isolée. Bien qu'il n'y ait pas restauration du phénotype sauvage, la souche 29C1 produit à nouveau un composé pigmenté. Son étude a été poursuivie.

III. Isolement et caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1

A. La sporulation n'est pas restaurée chez la souche 29C1

Afin de tester si la sporulation était restaurée, la souche 29C1 a été cultivée sur milieu HT

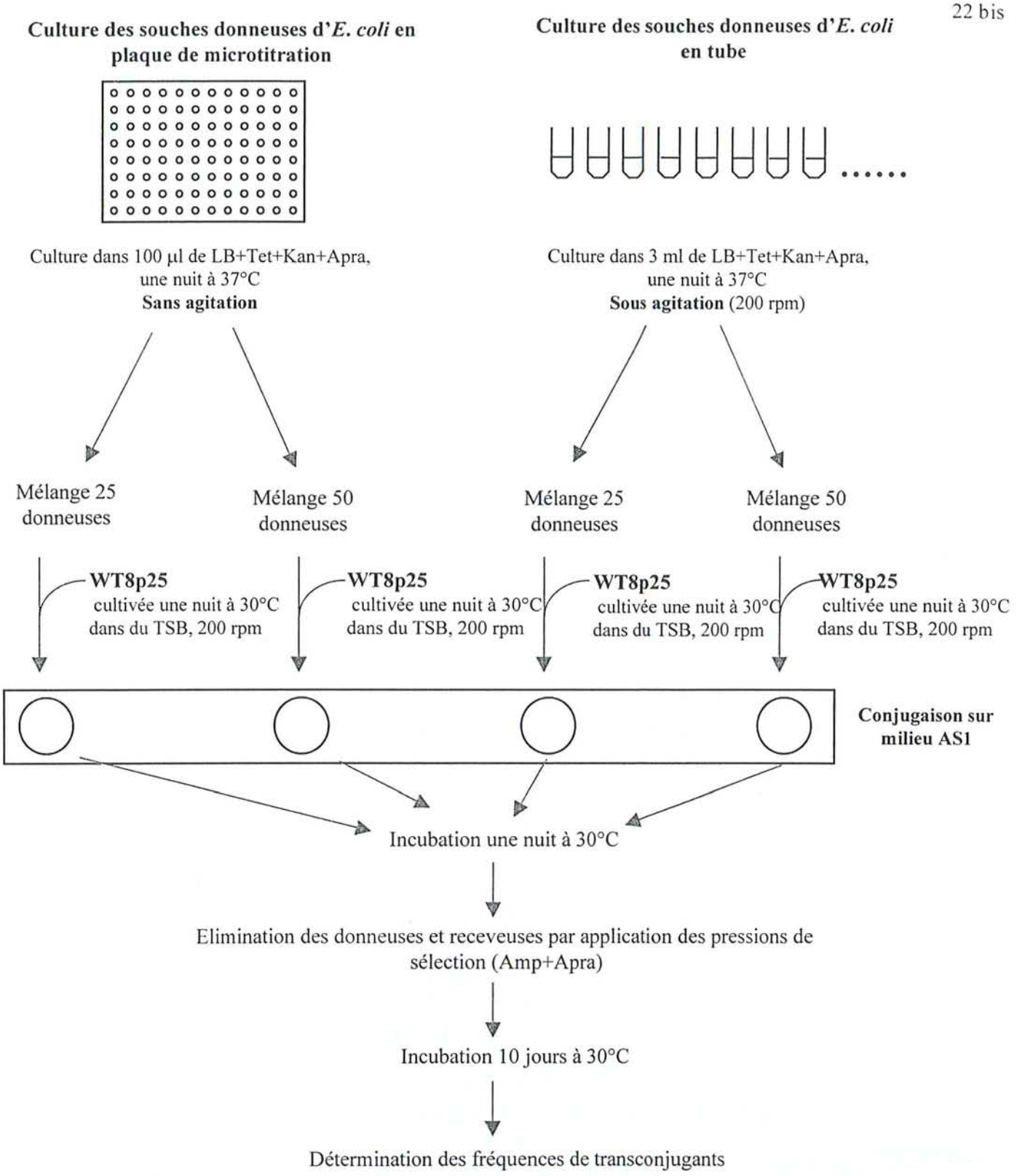


Figure 16. Représentation schématique du protocole de conjugaison employé pour la mise au point des conditions de criblage de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* MRF'307. Le mélange des donneuses est réalisé juste avant conjugaison de manière à éviter une compétition entre les différentes souches au sein d'une même culture. Les concentrations d'antibiotiques utilisées ainsi que la composition des différents milieux de culture employés sont indiquées dans la section "Matériels et Méthodes".

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

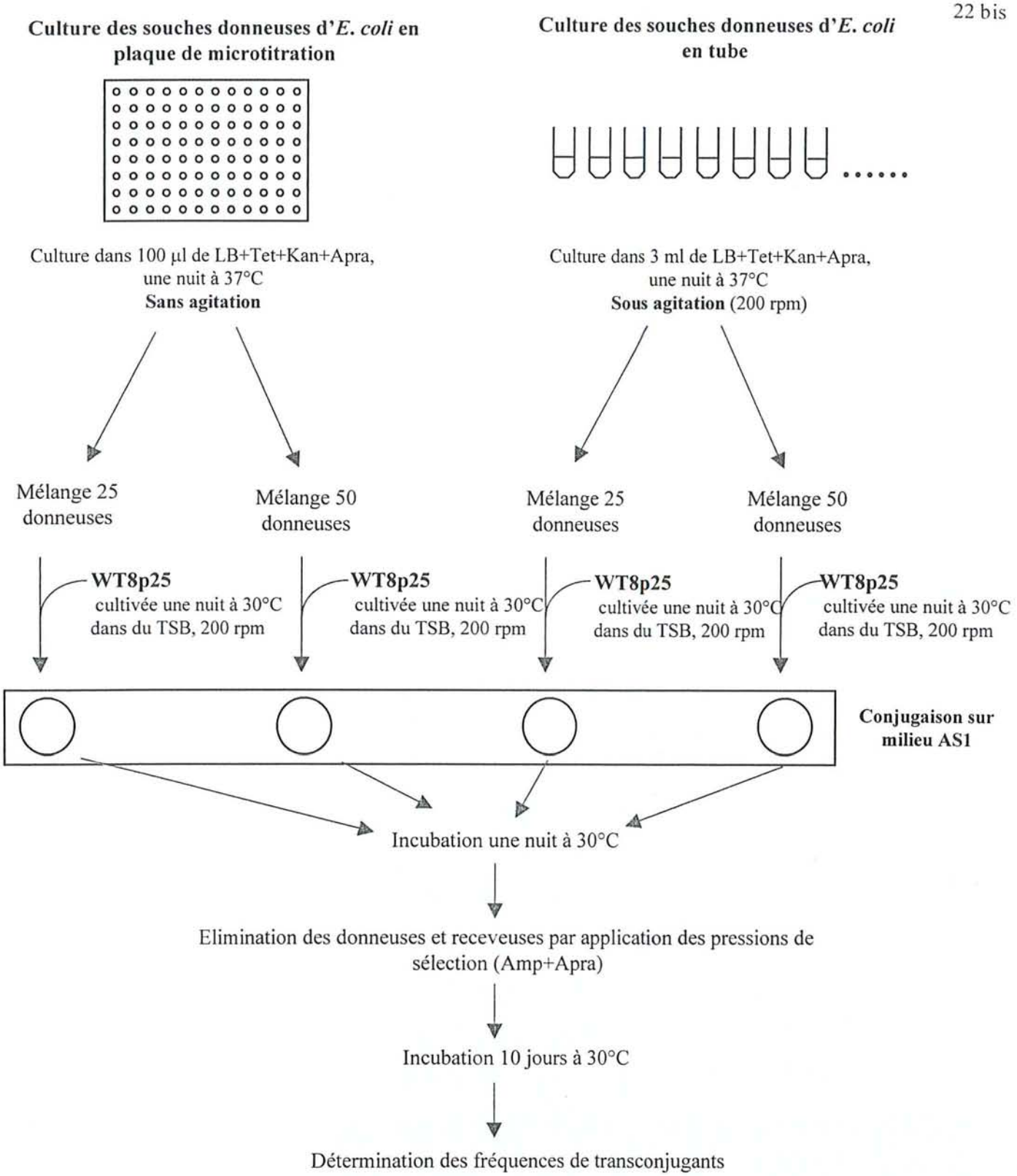


Figure 16. Représentation schématique du protocole de conjugaison employé pour la mise au point des conditions de criblage de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* MRF'307. Le mélange des donneuses est réalisé juste avant conjugaison de manière à éviter une compétition entre les différentes souches au sein d'une même culture. Les concentrations d'antibiotiques utilisées ainsi que la composition des différents milieux de culture employés sont indiquées dans la section "Matériels et Méthodes".

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Mélange	Conditions de culture des donneuses	Nombre de transconjugants par boîte	Nombre de transconjugants pour 100 UFC de receveuses
1 donneuse	tube	119	0,2
25 donneuses	tube	164	0,3
	cupule	66	0,13
50 donneuses	tube	163	0,3
	cupule	52	0,1

Tableau 11. Fréquence de transconjugants obtenus avec la souche receveuse *S. ambofaciens* WT8p25 et avec soit un clone, soit un mélange de 25 ou 50 clones de la banque d'ADN génomique. Le titre de la receveuse a été estimé à 5.10^5 UFC/ml après étalement de différentes dilutions de la culture sur milieu AS1 et après quelques jours d'incubation à 30°C.

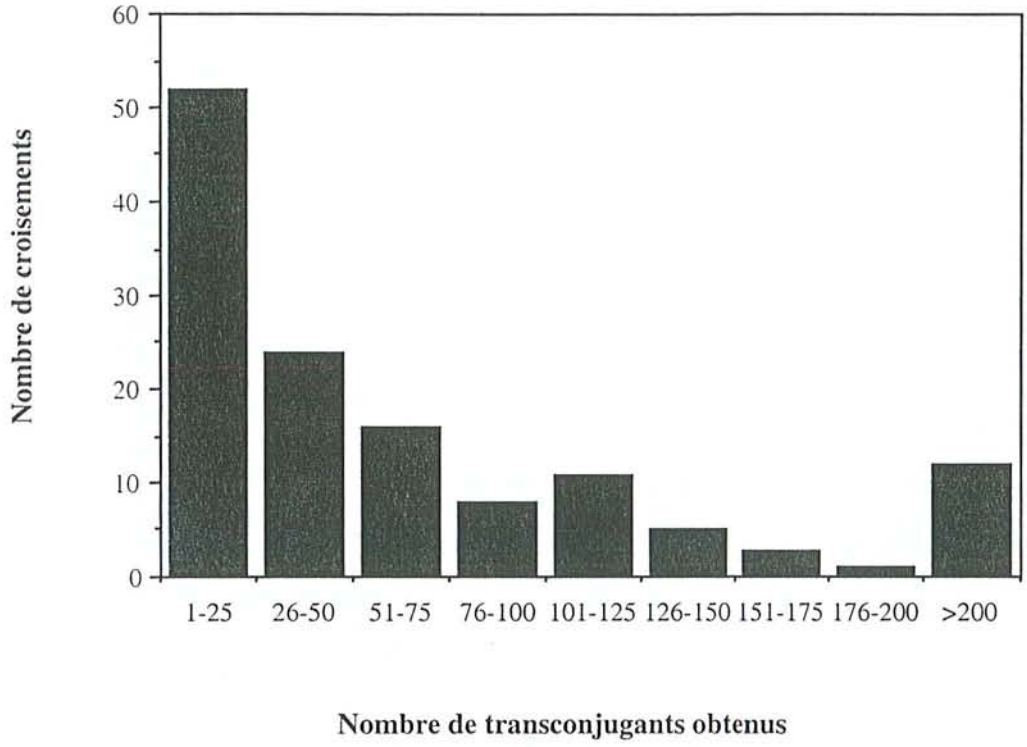


Figure 17. Histogramme représentant le nombre de transconjugants obtenus dans 130/132 croisements intergénériques *E. coli-Streptomyces* réalisés au cours du criblage partiel de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* réalisé chez *E. coli* MRF'307. Aucun transconjugant n'a été obtenu pour 2 des 132 croisements.

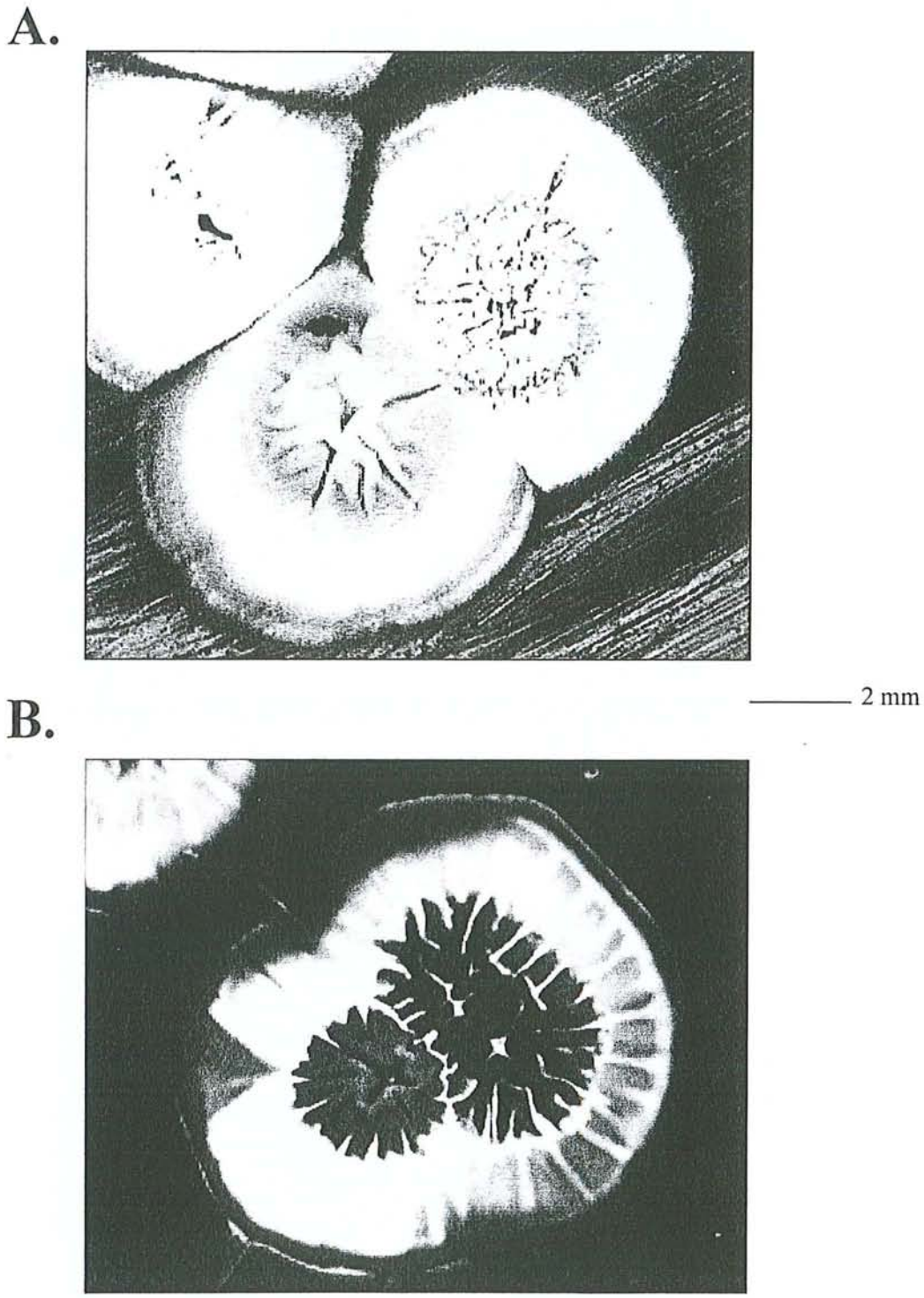


Figure 18. Phénotypes de colonies issus de la souche *S. ambofaciens* 29C1, observés après 14 jours de croisssance. **A.** Phénotypes observés avant sous-clonage de la souche 29C1. Une colonie pigmentée verte, caractéristique de la souche 29C1, et une colonie dépigmentée, caractéristique des mutants Pig^-_{pap}, sont présentées. **B.** Colonies issues de la souche 29C1, obtenues après sous-clonage.

complémenté en apramycine et ampicilline pendant 14 jours à 30°C. La sporulation des souches WT8, WT8p25 et WT8p25(pSET152) a également été testée sur milieu HT complémenté en ampicilline pour les souches WT8 et WT8p25 et en ampicilline et apramycine pour la souche WT8p25(pSET152). La présence de spores sur les colonies a été recherchée par observation des préparations sous microscope photonique, après une coloration de Gram des fragments de colonies. Alors que le sous-clone WT8 produit des spores (figure 19A), aucune spore libre n'a été observée pour les souches WT8p25 (figure 19B) et WT8p25(pSET152). De la même manière, aucune spore libre n'a été observée sur les préparations issues de la souche 29C1 (figure 19C). L'observation réalisée est qualitative et n'exclue pas formellement la présence de quelques spores sur les colonies. Néanmoins, la déficience en sporulation est sévère pour les souches WT8p25, WT8p25(pSET152) et 29C1. Ainsi, la souche 29C1 ne présente pas une sporulation sauvage.

B. Caractérisation moléculaire de la souche 29C1

1. La souche 29C1 est un dérivé de *S. ambofaciens* ATCC23877

Aucune pigmentation verte n'ayant été observée jusqu'à présent chez *S. ambofaciens*, une contamination de la culture par une autre souche de *Streptomyces* n'était pas exclue. Aussi, il était donc nécessaire de vérifier que la souche 29C1 dérivait bien de la souche *S. ambofaciens* ATCC23877. Pour cela, un ribotypage a été réalisé. Des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8, WT8p25(pSET152) et 29C1 ont été hybridés avec la sonde pOS113 qui porte le locus *rrnD* de *S. ambofaciens* ATCC23877 (Pernodet *et al.*, 1989). Les 3 profils obtenus étaient identiques entre eux (figure 20) et caractéristiques de celui de la souche *S. ambofaciens* ATCC23877. En conclusion, la souche 29C1 dérive de la souche ATCC23877, comme le sous-clone sauvage WT8 et la souche mutante WT8p25 (pSET152).

2. Vérification de la présence d'un plasmide recombinant intégré

Afin de tester la présence d'un plasmide pSET152 (recombinant ou non) dans le génome de la souche 29C1, des profils de restriction *Bam*HI et *Pst*I de l'ADN génomique des souches 29C1, WT8p25(pSET152) et du sauvage WT8 (témoin négatif) ont été hybridés avec le plasmide pSET152.

Comme cela est représenté dans la figure 21A, les 2 fragments *Bam*HI de 6,0 kb et de 11,0 kb (précédemment observés, figure 13) sont attendus si un plasmide pSET152 est intégré. C'est ce qui a été observé avec les souches WT8p25(pSET152) et 29C1 (figure 22). Par contre, le clonage ayant été réalisé dans le site *Bam*HI, cette hybridation ne permettait pas de savoir si le plasmide présent dans le génome de la souche 29C1 était recombinant. Dans le cas d'une hybridation de pSET152 sur un profil *Pst*I, 4 fragments sont attendus (figure 21B). Il s'agit des fragments de 2,4 kb et de 0,8 kb du plasmide et de 2 fragments flanquants le site *attB*. Il est à noter qu'un de ces 2 fragments peut ne pas être détecté en raison d'une faible longueur d'homologies entre ce fragment et la sonde pSET152. En effet, le site *attP* est situé à 0,2 kb du fragment *Pst*I de 0,8 kb (figure 21B). Cette hybridation a révélé un fragment de 5,4 kb dans les souches WT8p25(pSET152) et 29C1, un fragment de 2,4 kb chez la souche WT8p25(pSET152) et de 4 kb dans la souche 29C1 (figure 23). Le fragment de 0,8 kb n'a pas été détecté dans cette

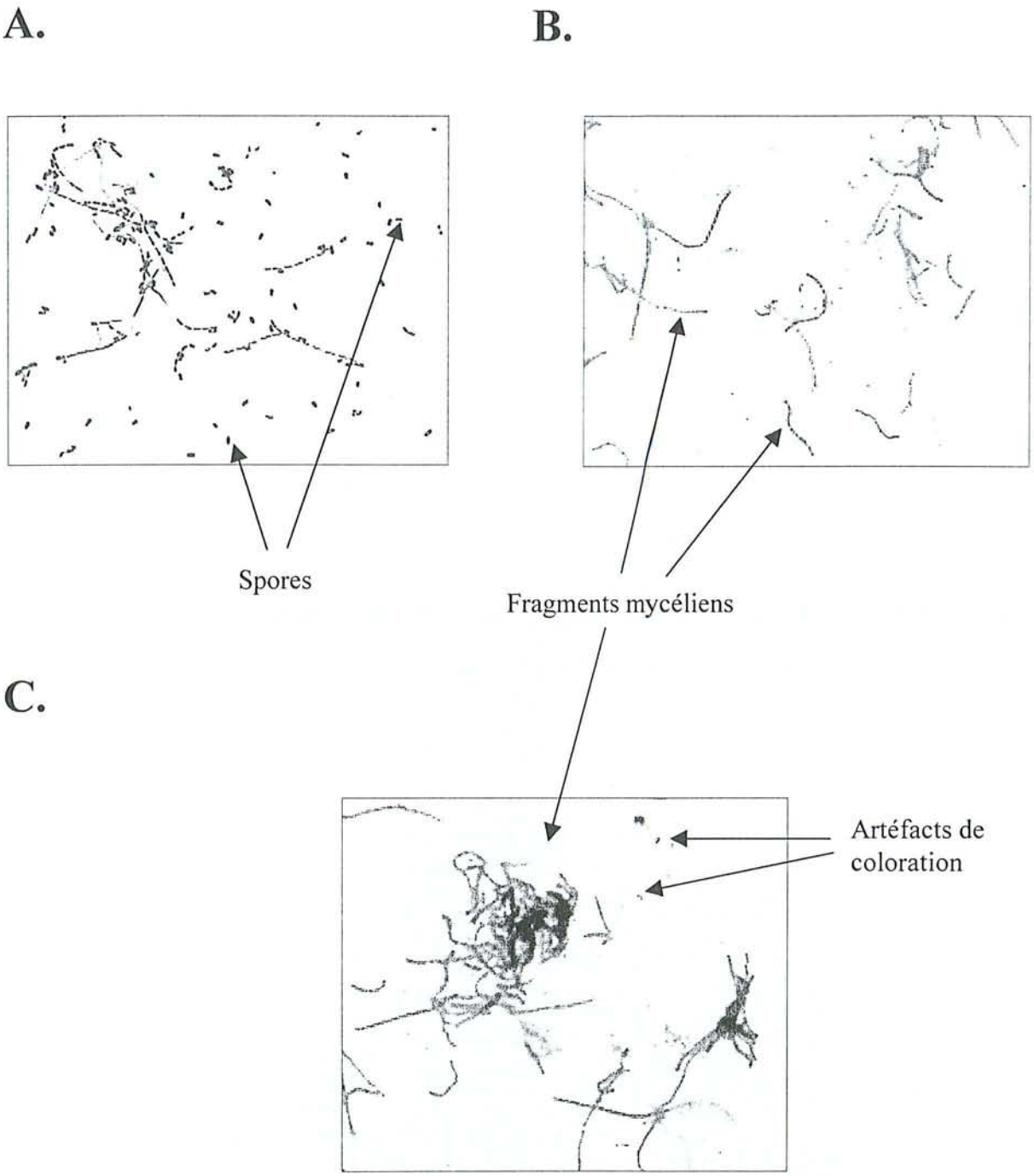


Figure 19. Fragments de colonies des souches *S. ambofaciens* WT8 (**A**), WT8p25 (**B**) et 29C1 (**C**), prélevés après 14 jours de croissance, après coloration de Gram. Grossissement 1000X.

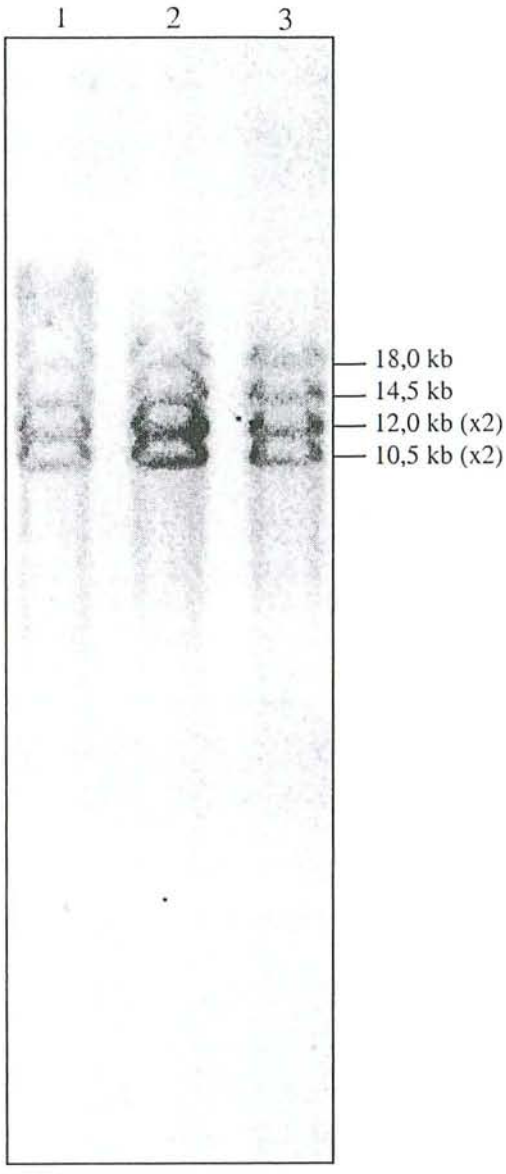


Figure 20. Hybridation de pOS113 sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 (piste 1), WT8p25(pSET152) (piste 2) et 29C1 (piste 3).

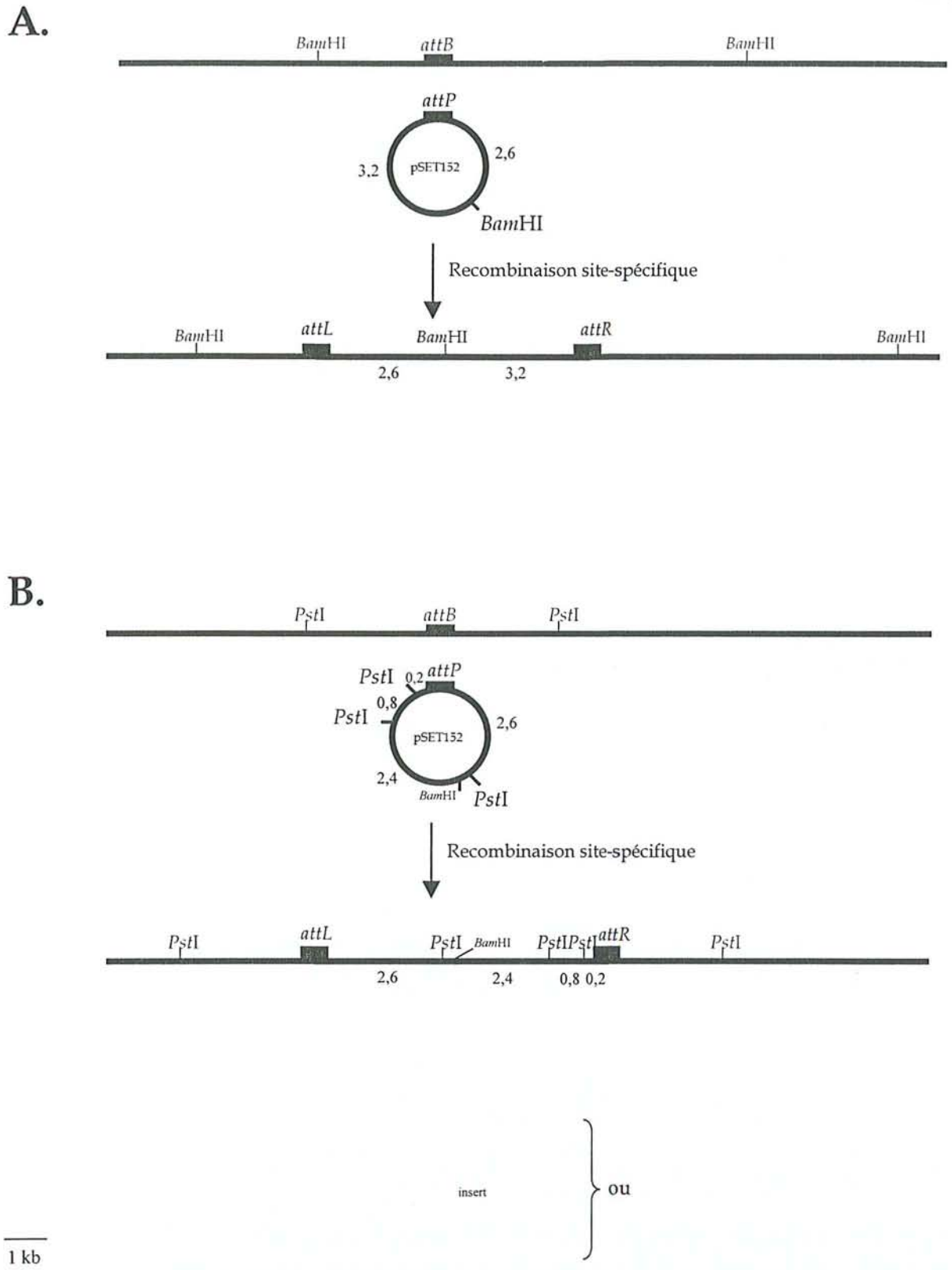


Figure 21. Schéma de l'intégration de pSET152 au niveau du site *attB* présent sur le chromosome de *S. ambofaciens*. Les situations avant et après intégration de ce plasmide sont présentées. Le plasmide intégré est flanqué par les sites *attL* et *attR*. **A.** Sites de restriction *Bam*HI présents sur pSET152 et adjacents au site *attB*. **B.** Sites de restriction *Pst*I présents dans pSET152 et adjacents au site *attB*. Le site de clonage *Bam*HI présent dans pSET152 est également indiqué. Les fragments *Bam*HI ou *Pst*I orange représentent les fragments attendus après hybridation de pSET152 sur l'ADN génomique d'une souche qui a intégré pSET152, digéré par une des 2 enzymes. La taille des fragments observés après hybridation est indiquée sur ce schéma en kilobases. Le fragment adjacent contenant le fragment de 0,2 kb de pSET152 n'a pas été détecté par hybridation (? : la taille de ce fragment attendu n 'est pas connue).

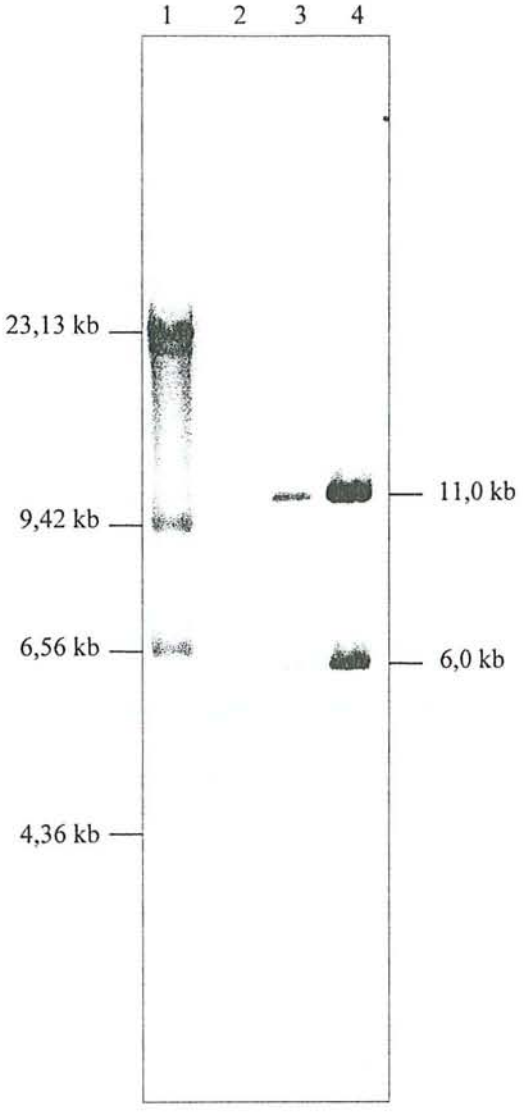


Figure 22. Profils d'hybridation de pSET152 sur les profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 (piste 2), WT8p25(pSET152) (piste 3) et 29C1 (piste 4). Piste 1 : Le marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hin*dIII.

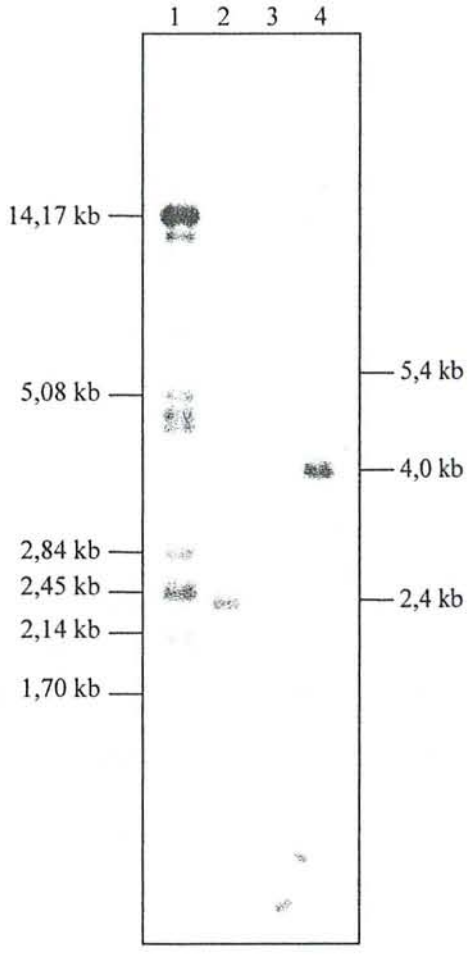


Figure 23. Hybridation de pSET152 sur un profil de restriction *Pst*I de l'ADN génomique de la souche WT8p25(pSET152) (piste2), de la souche WT8 (piste3) et de la souche 29C1 (piste 4). Piste 1 : Le marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Pst*I.

expérience, compte tenu des conditions de migration. Le fragment de 5,4 kb peut être interprété comme un des 2 fragments flanquant le site *attB*. La présence d'un fragment de 2,4 kb dans la souche WT8p25(pSET152) et d'un fragment de 4 kb dans la souche 29C1 indiquent la présence dans cette dernière d'un plasmide recombinant.

Si ces résultats montrent qu'un plasmide pSET152 recombinant est présent dans le génome de la souche 29C1, ils ne permettent pas de conclure quant à la taille de l'insert. En effet, si l'insert porte un site *Pst*I, alors, seule une partie de l'insert sera révélée après hybridation par pSET152.

3. Identification du clone recombinant

L'ADN plasmidique des 24 clones utilisés pour réaliser le mélange 29.2 dont est issu la souche 29C1, a été extrait et digéré par *Pst*I. Les 24 profils de restriction sont présentés sur la figure 24. Tous ces plasmides présentent les fragments *Pst*I de 2,6 kb et 0,8 kb de pSET152. Le fragment de 2,4 kb est absent de tous les clones, sauf 29D6 et 29D7. Dans le cas du clone 29D6, la présence d'un fragment intense de 5 kb suggère que le plasmide de ce clone est recombinant. Dans le cas du clone 29D7, un fragment peu intense (compte tenu de sa taille) de 5 kb est également présent mais résulte probablement d'une digestion partielle. Ce clone pouvait donc ne pas contenir un plasmide recombinant. Cette hypothèse a été confirmée en digérant ce plasmide par *Bam*HI. Une seule bande de 5,8 kb correspondant à pSET152 linéarisé a alors été observée (résultat non montré).

Comme la souche 29C1 possède dans son génome un fragment *Pst*I homologue à pSET152 de 4 kb, les plasmides présentant un fragment de cette taille ont été sélectionnés. Ainsi, les 10 plasmides possédant 1 fragment *Pst*I d'environ 4 kb ont été choisis. Des profils de restriction *Pst*I de ces 10 plasmides recombinants ainsi que de l'ADN génomique des souches WT8p25(pSET152), 29C1 et du sous-clone WT8 ont été hybridés avec le plasmide pSET152 (figure 25). 2 plasmides présentaient un fragment de taille comparable au fragment *Pst*I de 4 kb révélé dans la souche 29C1. Il s'agit de 29C1 et 29D3. La taille de ces 2 inserts a été déterminée en digérant l'ADN plasmidique de ces clones par *Bam*HI (figure 26). Ainsi, la taille des inserts est de 1,6 kb pour 29C1 et 14,8 kb pour 29D3.

Après hybridation du plasmide recombinant d'*E. coli* 29C1 sur des profils de restriction *Bam*HI de *S. ambofaciens* 29C1 et du sauvage WT8, un fragment de 1,6 kb a été détecté dans les 2 souches, confirmant l'origine de l'insert (figure 27). De plus, les fragments flanquant le site d'intégration *attB* de 11,0 kb et de 6,0 kb ne sont décelés que dans la souche 29C1. Enfin, l'hybridation de l'insert du plasmide recombinant 29C1 sur un profil de restriction *Pst*I de l'ADN génomique de la souche *S. ambofaciens* 29C1 révèle le fragment de 4 kb homologue à pSET152 (figure 28). Ainsi, le plasmide recombinant 29C1 est intégré dans le génome de la souche 29C1.

4. La souche 29C1 possède un réarrangement de grande taille dans son génome

L'analyse des profils de restriction *Bam*HI, *Pst*I, *Pvu*II et *Sph*I de l'ADN génomique de la souche 29C1 a révélé l'existence de bandes très intenses, caractéristiques de la présence d'une séquence amplifiée (ADS) (figure 29). La taille de l'ADS a été estimée à 40 kb.

Chez *Streptomyces*, ce type d'amplification est toujours associé à une délétion de taille

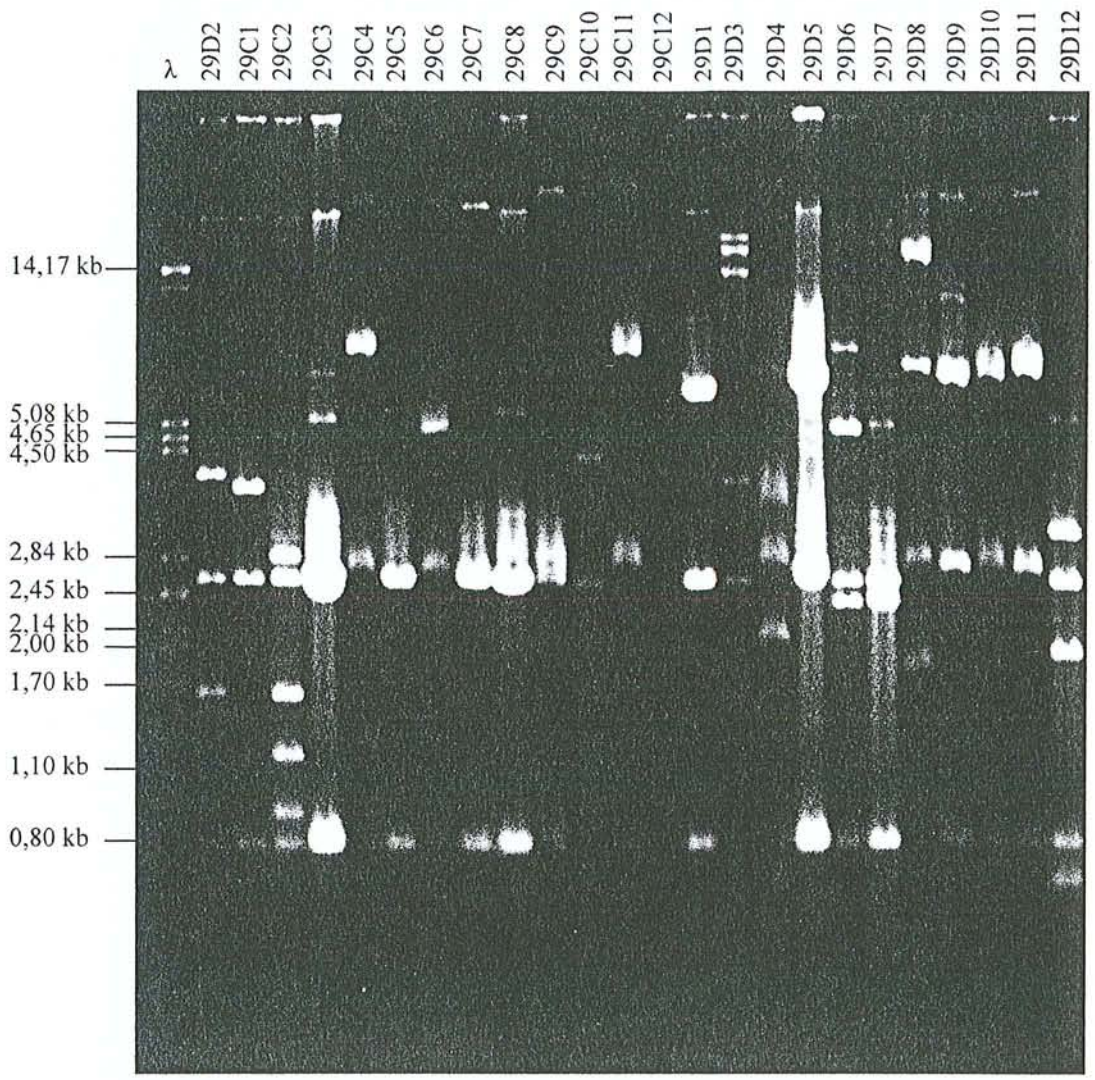


Figure 24. Profils de restriction *Pst*I des 24 plasmides recombinants extraits des clones utilisés pour le mélange 29.2. Le nom des plasmides est indiqué en haut de chaque piste. Le marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Pst*I. Le retard de migration observé pour les plasmides 29C4, 29C6, 29C11, 29D4, 29D8, 29D10 et 29D11 pourrait provenir de la préparation de l'ADN plasmidique (méthode d'extraction rapide, d'après Sambrook *et al.*, 1989).

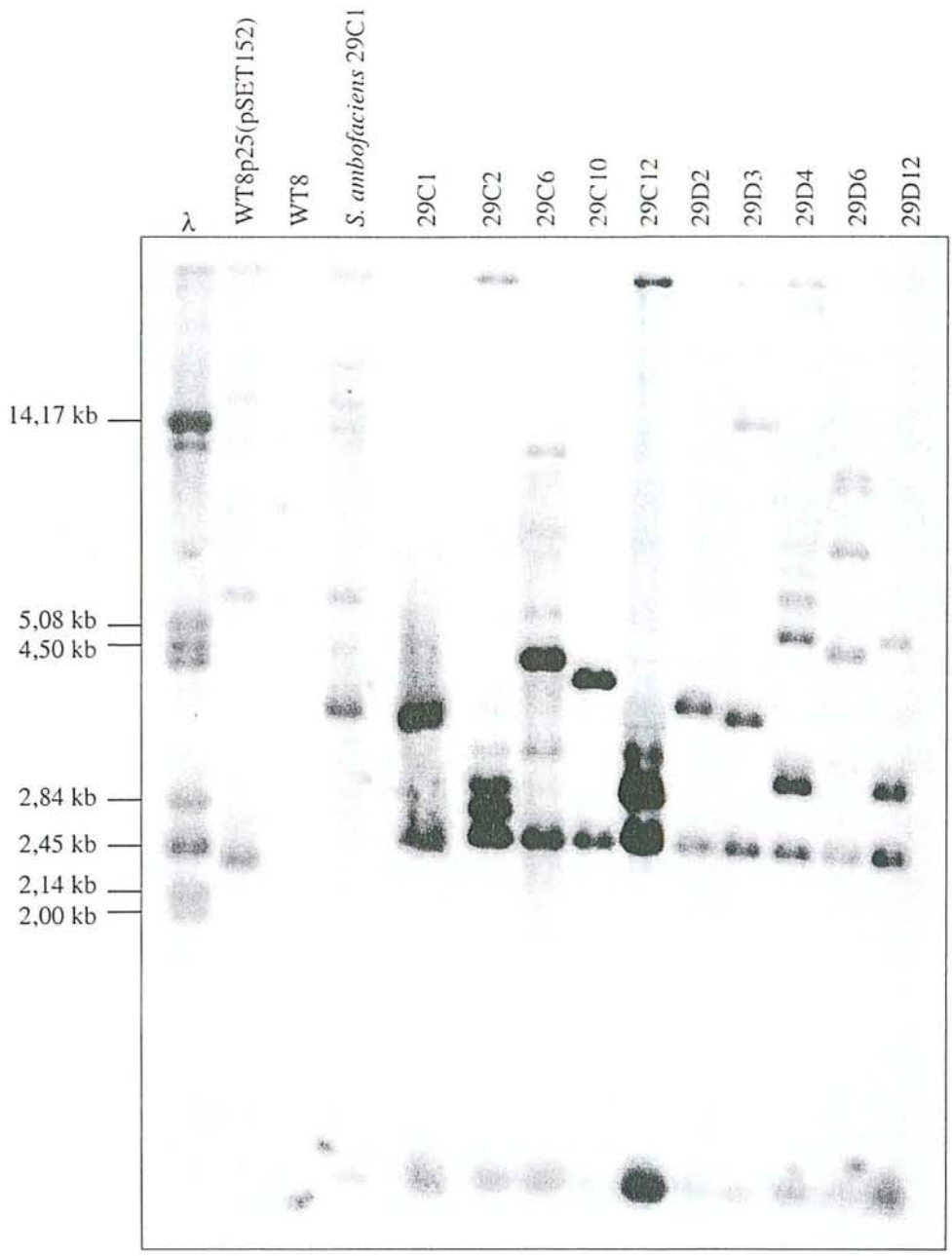


Figure 25. Profils d'hybridation de pSET152 sur des profils de restriction *Pst*I de l'ADN génomique des souches WT8p25(pSET152) (piste 2), WT8 (piste 3) et *S. ambofaciens* 29C1 (piste 4), et de l'ADN plasmidique de 10 clones recombinants dont les noms sont indiqués en haut de chaque piste. Piste λ : Le marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hin*dIII.

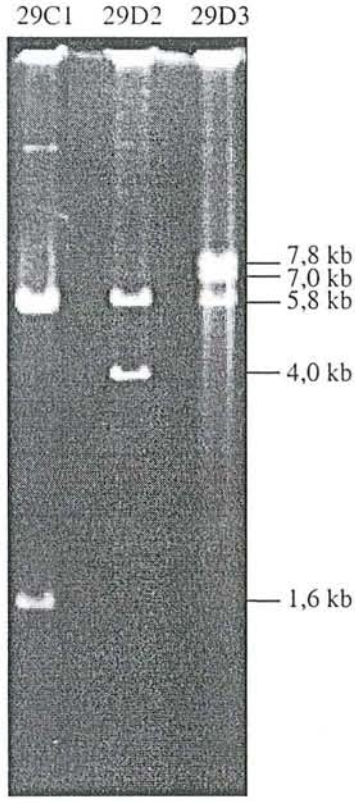


Figure 26. Estimation de la taille de l'insert de 3 plasmides recombinants : 29C1, 29D2 et 29D3. Les profils de restriction *Bam*HI obtenus pour ces 3 plasmides sont représentés dans cette figure. La bande à 5,8 kb correspond à pSET152 et les autres bandes observées à l'insert.

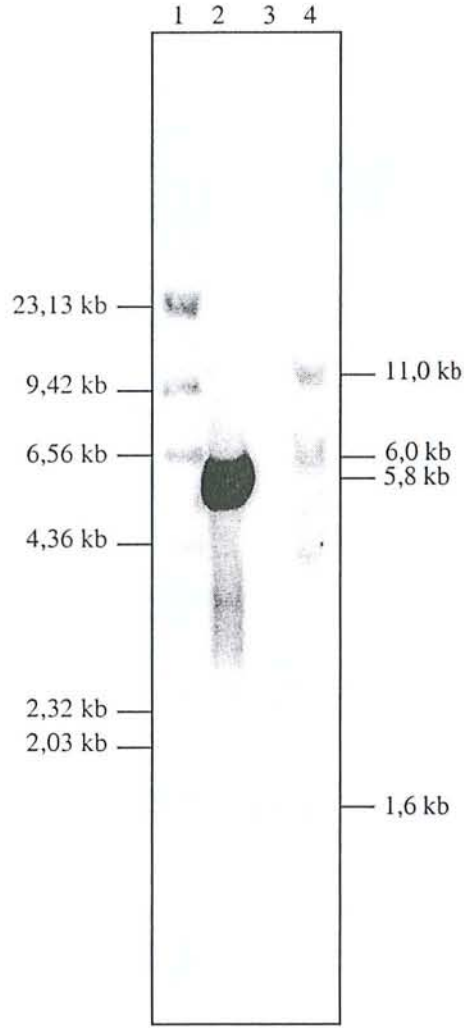


Figure 27. Profils d'hybridation obtenus avec le plasmide pSET152 recombinant 29C1 sur les profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 et 29C1 de *S. ambofaciens*. Piste 1 : marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hin*dIII. Piste 2 : plasmide pSET152 digéré par *Bam*HI. Piste 3 : souche WT8. Piste 4 : souche 29C1.

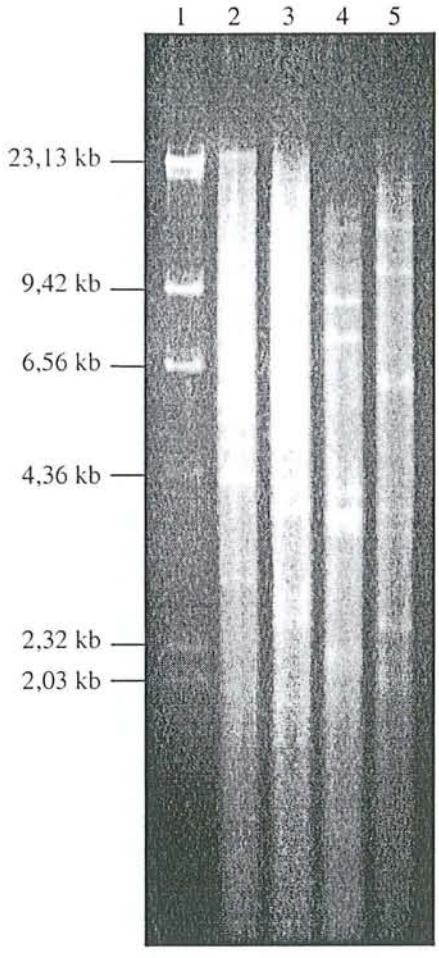


Figure 29. Amplification mise en évidence dans le génome de la souche *S. ambofaciens* 29C1. Profils de restriction *Bam*HI (piste 2), *Pst*I (piste 3), *Pvu*II (piste 4) et *Sph*I (piste 5) de l'ADN génomique de la souche 29C1. La piste 1 correspond au profil de restriction *Hin*dIII de l'ADN du bactériophage λ.

variable. Afin de rechercher ce type de délétion, des profils de restriction *Ase*I de l'ADN génomique du sous-clone sauvage WT8 et de la souche 29C1 ont été obtenus par électrophorèse en champs pulsés en faisant varier les conditions de migrations de façon à visualiser les différents fragments (figure 30). Ainsi, les fragments de 440 kb et de 820 kb observés dans les profils sauvages sont absents chez ceux du mutant. Le fragment de 1100 kb, contenant le site *attB*, est également absent et un fragment d'environ 880kb est présent dans le profil mutant. Aucun réarrangement n'avait été détecté jusqu'à présent dans le fragment *Ase*I de 1100 kb. Par contre, ce fragment comporte le site *attB* et le plasmide pSET152 présente un site *Ase*I. Ainsi, son intégration aboutit à la disparition du fragment de 1100 kb et à l'apparition de 2 fragments nouveaux. Le fragment *Ase*I de 880 kb observé chez la souche 29C1 pourrait être un de ces 2 fragments nouveaux, le deuxième ayant pu co-migrer avec d'autres fragments ou ne pas être détectable dans les conditions de migration utilisées. L'absence des fragments *Ase*I de 440 kb et de 820 kb suggérait qu'une des 2 extrémités étaient délétées. Afin de le vérifier, le cosmide recombinant D9 a été hybridé sur un profil de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique du sous-clone WT8 et de la souche 29C1 (figure 31). Les 2 souches présentaient le même profil d'hybridation. Ce résultat suggère qu'au moins une des 2 TIR est présente dans le génome de la souche 29C1.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que la souche 29C1 possède un chromosome amplifié et délété d'une extrémité (figure 32). Sa structure est vraisemblablement linéaire et la nouvelle extrémité de nature inconnue, comme cela a déjà été décrit chez d'autres mutants amplifiés (Fischer *et al.*, 1997a).

C. Recherche d'un composé pigmenté chez la souche 29C1

Ce travail a été réalisé, avec C. Schauner au laboratoire de Génétique et Microbiologie et en collaboration avec le Laboratoire de Fermentation et Bioconversion industrielle (ENSAIA, INPL) dirigé par Monsieur le Professeur Germain.

La souche NSA205 possède une amplification de l'AUD90, est non productrice de spiramycine et présente un contenu lipidique intracellulaire modifié (Dary *et al.*, 1992 ; Schauner *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré que l'AUD90 comporte un gène de polycétone synthétase (Aigle *et al.*, 1996). Schauner *et al.*, ont proposé que le phénotype de la souche NSA205 résulterait d'une déviation métabolique des précurseurs utilisés par les polycétones synthétases d'acides gras et de spiramycine vers un nouveau composé qui avait été visualisé en chromatographie en couche mince (CCM) (Schauner *et al.*, 1999). Nous avons cherché à déterminer si la souche 29C1, contenant une amplification, était également affectée dans son contenu lipidique global et si elle produisait un composé intracellulaire ou extracellulaire similaire à celui observé chez la souche NSA205.

L'analyse du contenu lipidique intracellulaire a été réalisée pour les souches *S. ambofaciens* RP181110 (ancêtre de la souche NSA205), *S. ambofaciens* NSA205 et *S. ambofaciens* 29C1, cultivées dans un milieu adapté à la production d'antibiotiques 120 h à 28°C, sous agitation (250 rpm). Les lipides intracellulaires totaux des 3 souches ont été extraits avec le mélange de Folch (Folch *et al.*, 1957) et le contenu lipidique total déterminé. Pour la souche RP181110, ce contenu a été estimé à 108 mg/g de matière sèche (MS), pour la souche NSA205 à 36 mg/g de MS et pour la souche 29C1

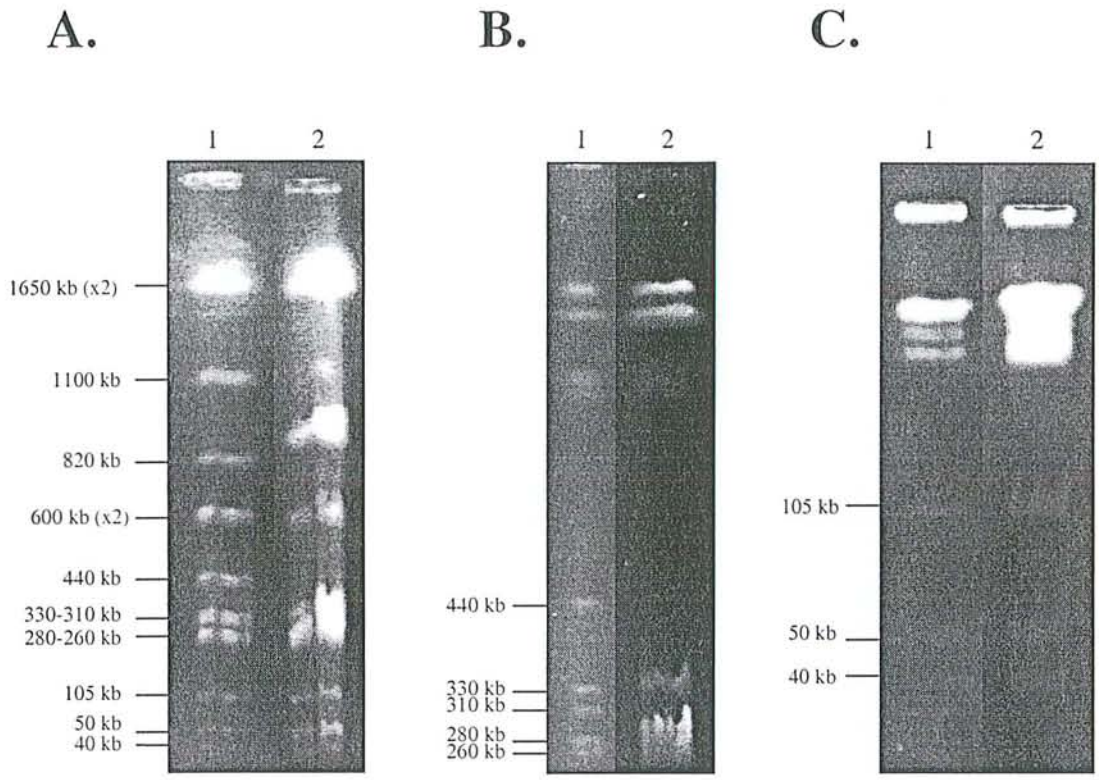


Figure 30. Profils de restriction *Ase*I de l'ADN génomique de WT8 (piste 1) et de 29C1 (piste 2), après électrophorèse en champs pulsés. **A.** Conditions de migration : 200 V, 24 h, 40 à 160 s, gel d'agarose 0,9%. **B.** Conditions de migration : 200 V, 36 h, 40 à 50 s, gel d'agarose à 0,9%. **C.** Conditions de migration : 200 V, 20 h, 2 à 20 s, gel d'agarose 1%.

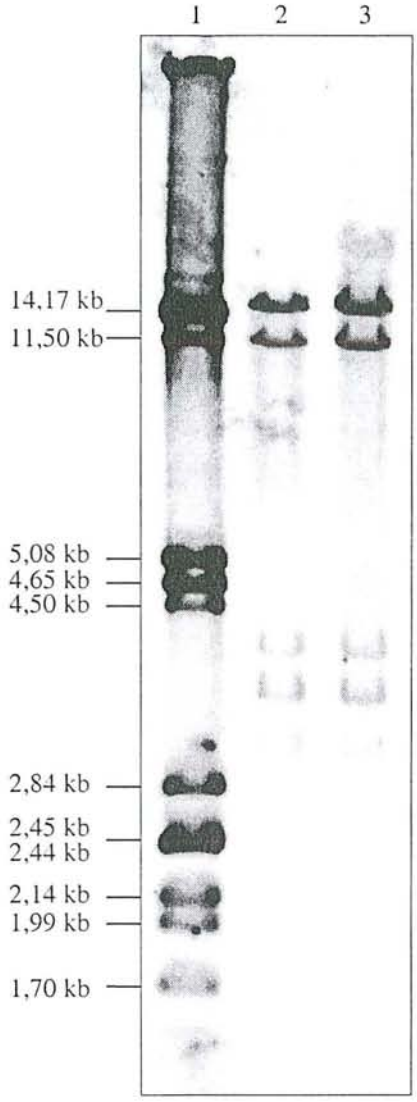


Figure 31. Hybridation du cosmide recombinant D9 sur un profil de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches sauvage WT8 (piste 2) et 29C1 (piste 3). Piste 1 : Le marqueur de taille utilisé est l'ADN du bactériophage λ digéré par *Pst*I.

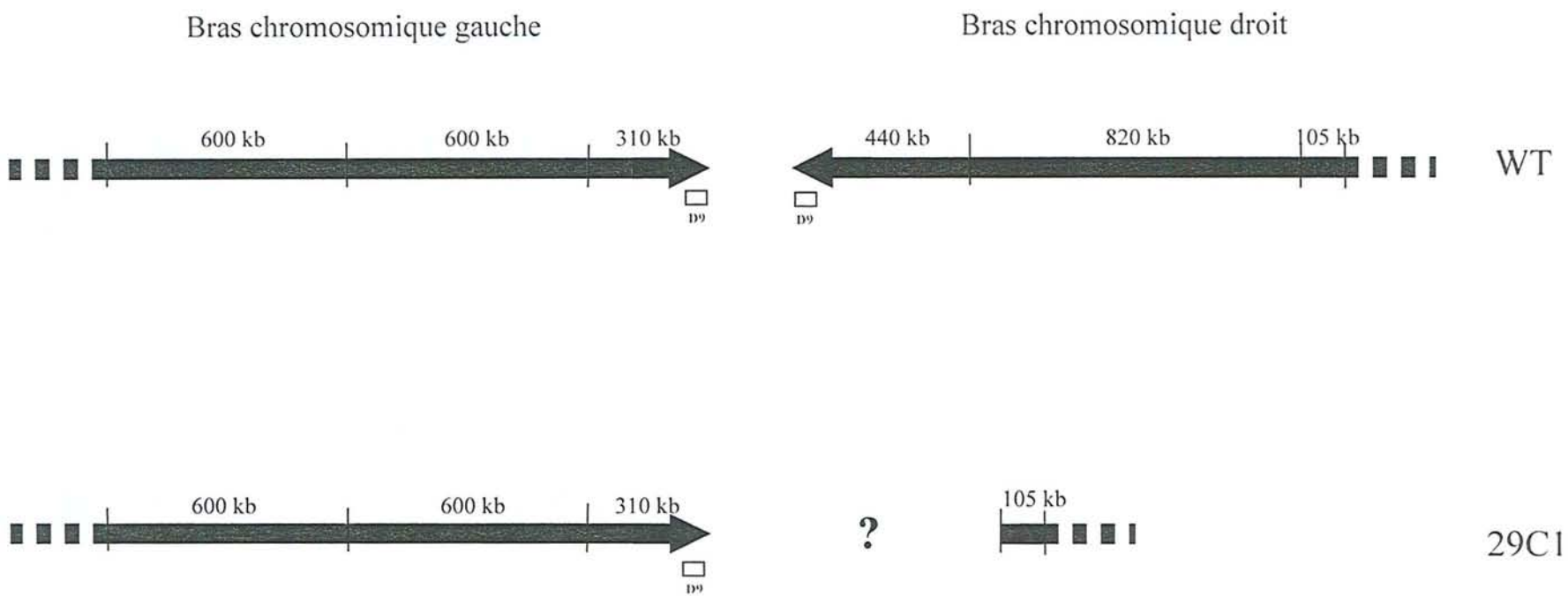


Figure 32. Carte de restriction *Ase*I des extrémités du chromosome de la souche de *S. ambofaciens* ATCC23877 (WT) et du chromosome de la souche 29C1. En bleu sont représentés les fragments *Ase*I observés en PFGE et la taille de ces fragments est indiquée au dessus de ces fragments. Les sites *Ase*I sont représentés par des tirets noirs verticaux et les TIR par des flèches noires. Le fragment en rose représente le fragment de 820 kb partiellement délété et dont la taille n'a pu être déterminée. La localisation des régions révélées par la sonde D9 est représentée sur la figure par des rectangles verts. Le point d'interrogation signifie que la nature de l'extrémité droite du chromosome de la souche 29C1 n'est pas connue.

à 56 mg/g de MS. Ces lipides ont été séparés en CCM en fonction de leur polarité dans le solvant de migration (chloroforme/éthanol/acétate d'ammonium pH 7). 0,8 mg de lipides ont été séparés pour chaque souche. La figure 33A montre les résultats obtenus avant coloration. Des pigments très apolaires sont observés pour les 3 souches. Pour la souche RP181110 et la souche NSA205, un composé apolaire (A, Rf#0,72) de couleur jaune orangé est visualisé. D'après l'intensité et la taille du spot jaune, ce pigment est synthétisé en plus faible quantité chez la souche NSA205. La souche 29C1 synthétise un composé de même Rf que le composé A mais de couleur marron. Cette couleur marron peut être associée à la pigmentation marron de la matière sèche de cette souche contre une pigmentation jaune pour les 2 autres souches. Des pigments polaires ont également été observés pour les 3 souches. La figure 33B montre les résultats après coloration à l'acide perchlorique (40%). Ce colorant aspécifique révèle de nombreux composés lipidiques intracellulaires. Les pigments qui ont été observés avant coloration (pigments jaune et marron apolaires Rf#0,72) sont colorés en marron-violet. Un nouveau composé (Rf#0,79) est révélé par cette coloration en rose-violet pour les souches NSA205 et 29C1. Ainsi, les souches NSA205 et 29C1 synthétiseraient un composé lipidique (non pigmenté) absent chez la souche RP181110.

S. ambofaciens ATCC23877 produit 2 antibiotiques connus : la spiramycine qui appartient au groupe des macrolides et la congocidine. Comme les macrolides sont extractibles à l'acétate d'éthyle, ce solvant a été utilisé pour rechercher des antibiotiques de ce groupe dans le surnageant de culture des 3 souches. Après extraction à l'acétate d'éthyle, CCM des composés extraits et coloration à l'acide perchlorique (40%), aucun des composés lipidiques intracellulaires précédemment décrits n'a été observé (figure 33C). Pourtant, la coloration du milieu de culture en jaune pour les souches RP181110 et NSA205 et en brun-vert pour la souche 29C1 suggère l'excrétion des pigments intracellulaires dans le milieu de culture. Les 3 formes de spiramycine (I, II et III) qui diffèrent par le radical R (R_I=H, R_{II}=$COCH_3$, R_{III}=$COCH_2CH_3$) ainsi que des formes intermédiaires sont révélées chez la souche RP181110. La souche NSA205 ne synthétise que la forme I en faible quantité comparée à la souche RP181110 ainsi que des formes intermédiaires. Aucun composé n'est révélé pour la souche 29C1, qui ne produit donc pas de spiramycine, d'intermédiaire de biosynthèse, ni d'autre composé extractible à l'acétate d'éthyle.

Afin de tester l'activité antibiotique de ces différents composés, une plaque de silice identique à celle de la figure 33C (non colorée) a été déposée sur une gélose ensemencée avec *B. subtilis* ATCC6633. Après 4 h d'incubation à 4°C pour permettre la diffusion des antibiotiques, la plaque a été incubée 8 h à 37°C afin de permettre la croissance de la souche cible. La croissance de *B. subtilis* ATCC6633 était inhibée au niveau du témoin, et au niveau de la spiramycine I et des formes intermédiaires pour la souche RP181110 et pour la souche NSA205. Aucune inhibition n'a été observée pour la souche 29C1. Par ailleurs, les composés lipidiques intracellulaires extraits ne présentent pas d'activité antibiotique sur *B. subtilis* (résultats non présentés).

En conclusion, la souche 29C1 est affectée dans son contenu lipidique global et produit un composé intracellulaire n'ayant pas d'activité antibiotique détectable avec la souche cible *B. subtilis* ATCC6633.

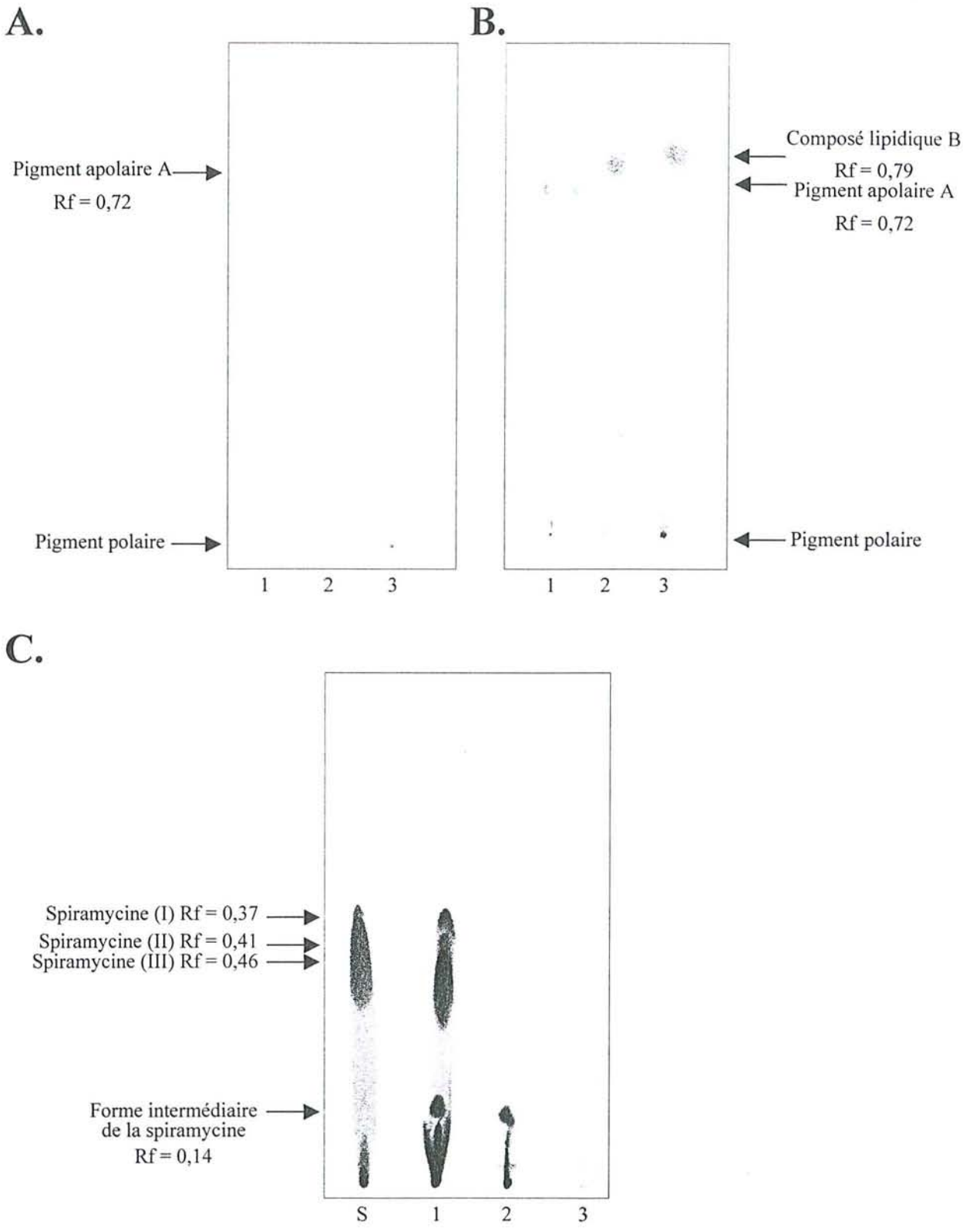


Figure 33. Analyse des composés (lipides totaux et macrolides) séparés en CCM dans un système apolaire pour les souches *S. ambofaciens* RP181110 (piste 1), *S. ambofaciens* NSA205 (piste 2) et *S .ambofaciens* 29C1 (piste 3). **A.** Photographie des lipides totaux séparés en CCM sans coloration. **B.** Photographie des lipides totaux séparés en CCM après révélation par carbonisation par l'acide perchlorique 40 % (v/v). **C.** Photographie des macrolides extraits à l'acétate d'éthyle du surnageant du milieu de culture des 3 souches et séparés en CCM. Les composés ont été révélés à l'acide perchlorique 40 % (v/v). La piste S correspond au dépôt de spiramycine base (0,5 mg). Le rapport frontal (Rf) a été déterminé et indiqué.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, un gène cible de l'état mutateur de *S. ambofaciens* ATCC23877 a été recherché en utilisant une approche de complémentation fonctionnelle d'un mutant Pig$^-$pap. Cette approche nécessitait dans un premier temps de disposer d'une souche de phénotype mutant suffisamment stable et dans laquelle il était possible d'introduire efficacement de l'ADN recombinant. C'est ainsi que la souche WT8p25 a été choisie comme hôte de clonage. Une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* a été réalisée et criblée par conjugaison intergénérique *E. coli-S. ambofaciens*. Le criblage d'une partie de cette banque a permis l'isolement de la souche 29C1 qui produit à nouveau un composé pigmenté mais différent de celui produit par la souche sauvage. Cependant, le phénotype de la souche 29C1 n'est pas restauré dans la production de spores. Cette souche possède dans son génome un plasmide recombinant issu de la banque et elle présente, en plus, un réarrangement de grande taille.

I. La souche WT8p25 est un hôte potentiel de clonage

L'instabilité génétique observée chez *S. ambofaciens* affecte la pigmentation des colonies même si d'autres caractères comme la sporulation ou la production d'antibiotiques peuvent également être mutés. L'identification des gènes impliqués dans le phénotype dépigmenté s'est longtemps heurtée à l'impossibilité d'utiliser pour le clonage, des mutants dépigmentés issus de l'instabilité génétique. En effet, chez la souche DSM40697, dans laquelle l'instabilité génétique a été initialement étudiée, tous les mutants dépigmentés présentent un réarrangement de grande taille, affectant plusieurs centaines de kb à chaque fois. De plus, dans la descendance de ces mutants, des réarrangements additionnels sont fréquemment observés (Fischer *et al.*, 1997a ; Leblond *et al.*, 1989 ; Leblond *et al.*, 1991). Enfin, étant donné les fréquences élevées d'instabilité observées (>1%), la fabrication d'une banque de mutants dépigmentés par mutagenèse insertionnelle n'était pas envisageable.

Chez la souche ATCC23877, il existe une modulation endogène de l'instabilité génétique et génomique qui se traduit par une variation des fréquences de délétions aux extrémités du chromosome. Il a notamment été observé que des mutants dépigmentés, non sporulants et résultant d'événements mutationnels survenus lors de la différenciation du mycélium aérien, n'étaient pas délétés. Il s'agit des mutants Pig$^-$pap (Martin *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 1999). La modulation de l'instabilité génétique observée a été interprétée comme le résultat de la mise en place d'un état mutateur dont l'une des cibles serait les gènes mutés chez les mutants Pig$^-$pap. C'est ainsi qu'une des approches permettant l'élucidation de la nature moléculaire de cet état mutateur impliquait l'identification des gènes cibles de cet état, et que pour cela, nous disposions maintenant de mutants non délétés.

Etant donné le phénotype de ces mutants, la recherche des gènes cibles pouvait être réalisée par complémentation du phénotype mutant par des gènes déjà connus chez d'autres *Streptomyces* pour intervenir dans la différenciation (ex : gènes *whi* de *S. coelicolor*). Une autre approche était de tenter d'isoler par mutagénèse insertionnelle des mutants de même phénotype que les mutants

Pig$^-$pap spontanés. Cette approche nécessitait un élément transposable se transposant avec efficacité dans la souche hôte et ne possédant pas de copie résidente chez *S. ambofaciens*. Nous ne disposions pas d'un tel système. Enfin, une troisième approche consistait à identifier les gènes mutés par complémentation fonctionnelle d'un mutant Pig$^-$pap. Cette approche permettait de ne pas faire d'hypothèse quant à la nature du(des) gène(s) muté(s) mais nécessitait le choix d'un hôte de clonage de phénotype stable.

Ainsi, le taux de réversion du phénotype mutant vers le phénotype sauvage a été estimé chez 5 souches Pig$^-$pap. Il est inférieur à 2.10^{-5}. L'étude de la descendance de 2 souches Pig$^-$pap, WT8p8 et WT8p25 a montré que si elles présentaient une instabilité génomique, celle-ci était similaire au sauvage. Ainsi, la stabilité du phénotype mutant et le niveau "sauvage" d'instabilité génomique confirmait la possibilité d'utiliser des mutants Pig$^-$pap comme hôtes de clonage. Enfin, si les résultats obtenus avec les souches WT8p8 et WT8p25 étaient généralisables à l'ensemble des mutants Pig$^-$pap, alors ceux-ci constituent les premiers mutants issus d'événémements d'instabilité qui ne sont pas plus instables que le sauvage. Cela confirme que ces mutants constituent un autre type d'instabilité génétique (Dary *et al.*, 2000).

L'introduction d'ADN étranger chez *Streptomyces* constitue une étape délicate puisque souvent à l'origine d'événements d'instabilité génétique. C'est tout particulièrement le cas lors des transformations qui nécessitent chez les *Streptomyces*, la formation de protoplastes (Hütter et Eckhardt, 1988). L'infection par des phages ne pouvant pas avoir lieu avec ces mutants, la conjugaison intergénérique *E. coli-S. ambofaciens* a alors été envisagée. Ainsi, nous avons montré que 2 mutants Pig$^-$pap (WT8p8 etWT8p25) étaient capables de conjuguer avec *E. coli* S17-1(pSET152) et *E. coli* MRF'307(pSET152) avec une efficacité similaire à celle du sous-clone sauvage WT8. Nous avons donc choisi d'utiliser la souche WT8p25 comme hôte de clonage car elle ne réverse pas à haute fréquence, présente une instabilité génomique similaire à celle du sauvage et est capable de conjuguer avec *E. coli*.

II. Criblage de la banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* construite chez *E. coli* MRF'307

Nous disposons à présent d'une banque d'ADN génomique de 7400 clones, ce qui permet de recouvrir tout le génome de *S. ambofaciens* avec un probabilité de 0,997.

Bien que le crible utilisé soit positif puisqu'il s'agissait d'identifier un clone pigmenté dans une population de colonies blanches, la taille de la banque nécessitait d'une part de regrouper les donneuses par croisement et d'autre part de pouvoir en cultiver, un grand nombre. Ainsi, les souches donneuses ont été cultivées en plaque de microtitration et regroupées en pool de 24 pour chaque croisement. Pour près de la moitié de ceux-ci, le nombre de transconjugants obtenus était inférieur à 25. Plusieurs facteurs peuvent être pris en compte pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, la culture en plaque de microtitration des souches donneuses se fait sans agitation, ce qui a une incidence sur le métabolisme de la souche et peut-être sur l'efficacité de transfert. En effet, une conjugaison efficace requiert habituellement des souches en phase exponentielle de croissance, cultivées sous agitation. Effectivement, une diminution du nombre de transconjugants a été observée lorsque les souches donneuses étaient cultivées en plaque de microtitration plutôt qu'en

tube sous agitation. La taille du plasmide transféré pourrait également avoir un incidence sur l'efficacité du transfert. Ce paramètre n'a pas été pris en compte dans nos expériences. Enfin, le rapport donneuse sur receveuse est important puisque Matsuchima et Baltz ont montré que le nombre de transconjugants augmentait avec ce rapport (Matsushima et Baltz, 1996). Pour pouvoir poursuivre efficacement le criblage de la banque, il nous faudra maîtriser ces paramètres et déterminer également si chaque colonie transconjugante est issue d'un événement unique de transfert. En effet, si chaque colonie était un mélange de mycélium ayant reçu différents plasmides, alors la portion de la banque testée, est très probablement supérieure à 25%. Le fait d'avoir obtenu après conjugaison une colonie dépigmentée à secteur pigmenté vert suggère q'un transconjugant est le résultat du transfert de plusieurs plasmides, si le phénotype pigmenté vert (Pig_{vert}) résulte de la présence du plasmide recombinant.

III. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1

Un transconjugant, pigmenté, a été obtenu après croisement du mutant Pig^{-}_{pap} WT8p25 et du mélange 29.2 de la banque d'ADN génomique. Après plusieurs sous-clonages, cette souche sélectionnée pour son phénotype pigmenté vert a été nommée 29C1. Ce phénotype n'avait jamais été observé auparavant chez *S. ambofaciens*. Même s'il y a production de pigment, le phénotype sauvage n'est pas restauré pour la pigmentation et la sporulation puisque la souche 29C1 ne sporule pas. Cette souche possède dans son génome un plasmide recombinant porteur d'un insert de 1,6 kb mais également un réarrangement de grande taille consistant en la délétion de plusieurs centaines de kb et une amplification d'une séquence d'environ 40 kb. Ainsi, malgré la présence d'un plasmide recombinant dans son génome, il est difficile de savoir si le phénotype Pig_{vert} observé est le résultat de la présence de l'insert du plasmide recombinant intégré, ou du réarrangement observé, ou des 2 à la fois. Une première approche, pour répondre à cette question est d'une part de réintroduire le plasmide 29C1 dans la souche mutante WT8p25 et d'autre part de sélectionner un dérivé de la souche 29C1 ayant perdu le plasmide 29C1. Dans le premier cas, la synthèse du pigment vert devrait être observée tandis qu'une excision devrait aboutir à la perte de cette synthèse dans le deuxième cas.

Chez *S. ambofaciens*, la presque totalité des amplifications a été localisée dans deux régions : la région de l'AUD6 et la région de l'AUD90. Ainsi, il serait intéressant de déterminer à quelle AUD appartient cette amplification. Pour cela, des hybridations entre des cosmides recombinants révélant la région de l'AUD6 (Leblond *et al.*, 1996) et de l'AUD90 (Fischer *et al.*, 1997a) et des profils de restriction de l'ADN génomique de la souche 29C1 et du sous-clone sauvage WT8 sont actuellement en cours.

Bien que la localisation de l'unité amplifiable contenue dans la souche 29C1 ne soit pas connue, l'analyse des lipides intracellulaires a révélé des similitudes avec la souche NSA205 qui porte une amplification de l'AUD90. En effet, ces 2 souches présentent un contenu lipidique intracellulaire significativement plus faible que celui de la souche de référence RP181110 et présentent un composé lipidique intracellulaire révélé après coloration à l'acide perchlorique, absent de la souche de référence RP181110. L'amplification observée chez 29C1 pourrait

appartenir à la région de l'AUD90 comme celle de la souche NSA205 et donc entraîner les mêmes effets. Une hypothèse alternative est de considérer que la synthèse de ce composé intracellulaire résulte de la délétion présente chez les souches NSA205 et 29C1. En effet, la souche NSA205 présente une délétion affectant les mêmes fragments *Ase*I que la souche 29C1, à l'exception du fragment *Ase*I de 820 kb qui comporte l'amplification chez la souche NSA205.

Il a été montré que l'amplification de la souche NSA205 est instable et perdue à haute fréquence. Cette perte est strictement associée à un retour à la production de spiramycine (Dary *et al.*, 1992). De plus, l'étude du contenu lipidique d'un dérivé de la souche NSA205, ayant perdu l'amplification et retrouvé une production d'antibiotique, a révélé que cette souche était globalement restaurée dans son contenu lipidique intracellulaire (Schauner *et al.*, 1999). C'est pourquoi, il est peu probable que le phénotype de la souche NSA205 ne résulte que de la délétion. Ainsi, par extrapolation, l'altération observée chez la souche 29C1 pourrait également résulter de la présence de l'ADS.

IV. Perspectives

Poursuivre le criblage de la banque permettra à terme l'identification de(s) gène(s) cible(s) de l'instabilité génétique. Jusqu'à présent les mutants Pig$^-$pap semblent constituer une catégorie homogène puisque tous sont dépigmentés, ne sporulent pas et ne présentent pas de délétion de grande taille, bien qu'issus d'événements d'instabilité génétique. Une telle homogénéité suggère qu'ils pourraient être mutés dans le même gène. Il s'agirait donc d'un gène hautement mutable et il serait alors intéressant de déterminer le type de mutation retrouvée à chaque fois. De plus, le fait que ces mutants proviennent de papilles dépigmentées soulève la question de la relation qui peut exister entre le niveau de mutabilité et le stade de développement. Ainsi, disposer du gène muté chez la souche WT8p25, nous permettra de rechercher ce gène dans d'autres mutants, en l'amplifiant directement à partir de l'ADN génomique, et donc d'apporter des éléments de réponse à cette problématique. La formation d'un nombre variable de papilles est une des caractéristiques de l'état mutateur. Caractériser un gène cible peut nous permettre d'élucider, au moins en partie, la nature moléculaire de cet état et donc d'aborder l'étude de fonctions contrôlant l'intégrité du génome. De telles fonctions qui sont encore très peu connues chez *Streptomyces*.

La souche 29C1 a été isolée au cours de ce travail et un début de caractérisation phénotypique et moléculaire réalisé. Sa caractérisation sera poursuivie de façon à établir le déterminisme génétique à l'origine du phénotype pigmenté vert. La nature du composé intracellulaire produit dans les souches 29C1 et NSA205 sera également déterminée. Si ce composé ne présente pas une activité antibactérienne Gram+, il serait intéressant de savoir s'il possède une autre activité biologique de type antifongique ou autre. D'un point de vue plus fondamental, cette étude soulève 2 questions importantes. La première concerne le rôle jouer par les métabolites secondaires chez ces bactéries : composés utilisés par la bactérie ou fonctions ancestrales utilisées au cours de l'évolution biochimique des cellules (Davies, 1990). La deuxième question concerne l'avantage que peut conférer la très grande plasticité du métabolisme de ces bactéries qui se traduit par exemple par la synthèse de pigments variés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABRAHAM J. M., FREITAG C. S., CLEMENTS J. R., and EISENSTEIN B. I.
An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5724-5727.

ABRAHAM S. N., and BEACHEY E. H.
Assembly of a chemically synthesized peptide of *Escherichia coli* type 1 fimbriae into fimbria-like antigenic structures.
J. Bacteriol., 1987, 169, 2460-2465.

AIGLE B., SCHNEIDER D., MORILHAT C., VANDEWIELE D., DARY A., HOLL A. C., SIMONET J. M., and DECARIS B.
An amplifiable and deletable locus of *Streptomyces ambofaciens* RP181110 contains a very large gene homologous to polyketide synthase genes.
Microbiology, 1996, 142, 2815-2824.

ALM R. A., LING L. S. L., MOIR D. T., KING B. L., BROWN E. D., DOIG P. C., SMITH D. R., NOONAN B., GUILD B. C., DEJONGE B. L., CARMEL G., TUMMINO P. J., CARUSO A., URIA-NICKELSEN M., MILLS D. M., IVES C., GIBSON R., MERBERG D., MILLS S. D., JIANG Q., TAYLOR D. E., VOVIS G. F., and TRUST T. J.
Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.
Nature, 1999, 397, 176-180.

AUBERT M., WEBER E., GINTZ B., CHATER K. F., and DECARIS B.
Inactivation or amplification of the *spa2* gene, encoding a potencial stationary-phase regulator, affects differentiation in *Streptomyces ambofaciens*.
Can. J. Microbiol., 1997, 43, 1118-1125.

BALTZ R. H.
Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration.
J Gen. Microbiol., 1978, 107, 93-102.

BALTZ R. H.
Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*.
Dev Ind Microbiol, 1980, 21, 43-54.

BARBOUR A. G.
linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation.
Trends Microbiol, 1993, 1, 236-239.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

BARTLETT D. H., WRIGHT M. E., and SILVERMAN M.
Variable expression of extracellular polysaccharide in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica* is controlled by genome rearrangement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 3923-3927.

BENNETT P. M., GRINSTED J., and RICHMOND M. H.
Transposition of TnA does not generate deletions.
Mol. Gen. Genet., 1977, 154, 205-211.

BIERMAN R., LOGAN R., O'BRIEN K., SENO E. T., NAGARAJA RAO R., and SCHONER B. E.
Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.
Gene, 1992, 116, 43-49.

BLOMFIELD I. C., KULASEKARA D. H., and EISENSTEIN B. I.
Integration host factor stimulates both FimB- and FimE-mediated site-specific DNA inversion that controls phase variation of type 1 fimbriae expression in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol., 1997, 23, 705-717.

BRAATEN B. A., NOU X., KALTENBACH L. S., and LOW D. A.
Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*.
Cell, 1994, 76, 577-588.

BRANA A. F., MENDEZ C., DIAZ L. A., MANZANAL M. B., and HARDISSON C.
Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*.
J. Gen. Microbiol., 1986, 132, 1319-1326.

CAILLET-FAUQUET P., MAENHAUT-MICHEL G., and RADMAN M.
SOS mutator effect in *E. coli* mutants deficient in mismatch correction.
EMBO J., 1984, 3, 707-712.

CHALMERS R., and BLOT M.
Insertion sequences and transposons.
in Organization of the prokaryotic genome edited by R. L. Charlebois, 1999, 151-169.

CHAO L., VARGAS C., SPEAR B. B., AND COX E. C.
Transposable elements as mutator genes in evolution.
Nature, 1983, 16-22;303, 633-635.

CHATER K. F.
Genetics of differentiation in *Streptomyces*.
Annu. Rev. Microbiol., 1993, 47, 685-713.

CHATER K. F.
Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony.
Microbiology, 1998, 144, 1465-1478.

CHATER K. F., BRUTON C. J., PLASKITT K. A., BUTTNER M. J., MÉNDEZ C., and HELMANN J. D.
The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B. subtilis*.
Cell, 1989, 59, 133-143.

CHATER K. F., and HOPWOOD D. A.
Streptomyces genetics.
in The Biology of the Actinomycetes edited by M. Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams, 1984, 229-286.

CHU G., VOLLRATH D., and DAVIS R. W.
Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields.
Science, 1986, 234, 1582-1585.

DARY A., BOURGET N., GIRARD N., SIMONET J. M., and DECARIS B.
Amplification of a particular DNA sequence in *Streptomyces ambofaciens* RP181110 reversibly prevents spiramycin production.
Res. Microbiol., 1992, 143, 99-112.

DARY A., KAISER P., BOURGET N., THOMPSON C. J., SIMONET J. M., and DECARIS B.
Large genomic rearrangements of the unstable region of *Streptomyces ambofaciens* are associated with major changes in global gene expression.
Mol. Microbiol., 1993, 10, 759-769.

DARY A., MARTIN P., WENNER T., DECARIS B., and LEBLOND P.
DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control.
Biochimie, 2000, 82, 2934.

DAVIES, J.
What are antibiotics? Archaic functions for modern activities.
Mol. Microbiol., 1990, 4, 1227-1232.

DAVIS N. K., and CHATER K. F.
The *Streptomyces coelicolor whi*B gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation.
Mol. Gen. Genet., 1992, 232, 351-358.

DE BOLLE X., BAYLISS C. D., FIELD D., VAN DE VEN T., SAUNDERS J., HOOD D. W., and MOXON R.
The lenght of a tetranucleotide repeat tract in *Haemophilus influenzae* determines the phase variation rate of a gene with homology to type III DNA methyltransferases.
Mol. Microbiol., 2000, 35, 211-222.

DEMUYTER P., LEBLOND P., DECARIS B., and SIMONET J.M.
Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*.
J. Gen. Microbiol., 1988, 134, 2001-2007.

DORMAN C. J., and HIGGINS C. F.
Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases.
J. Bacteriol., 1987, 169, 3840-3843.

DOWER W. J., MILLER J. F., and RAGSDALE C. W.
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Res., 1988, 16, 6127-6145.

DYBVIG K.
DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes.
Mol. Microbiol., 1993, 10, 465-471.

FERNANDEZ-MORENO M. A., CABALLERO J. L., HOPWOOD D. A., and MALPARTIDA F.
The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bld*A tRNA gene of *Streptomyces*.
Cell, 1991, 66, 769-780.

FISCHER G., DECARIS B., and LEBLOND P.
Occurrence of deletions associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA.
J. Bacteriol., 1997a, 179, 4553-4558.

FISCHER G., KYRIACOU A., DECARIS B., and LEBLOND P.
Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*.
Biochimie, 1997b, 79, 555-558.

FISHMAN S. E., and HERSHBERGER C. L.
Amplified DNA in *Streptomyces fradiae*.
J. Bacteriol., 1983, 155, 459-466.

FLETT F., MERSINIAS V., and SMITH C. P.
High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*.
FEMS Microbiol. Lett., 1997, 155, 223-229.

FOLCH J., LEES M., and SLOANE-STANLEY G. H.
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem., 1957, 226, 497-509.

GIEBELHAUS L. G., FROST L., LANKA E., GORMLEY E. P., DAVIES J. E., and LESKIW B.
The Tra2 core of the IncPα plasmid RP4 is required for intergeneric mating between *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*.
J. Bacteriol., 1996, 178, 6378-6381.

HAAS R., SCHWARZ H., and MEYER T. F.
Release of soluble pilin antigen coupled with gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9079-9083.

HARRIS R. S., FENG G., ROSS K. J., SIDHU R., THULIN C., LONGERICH S., SZIGETY S. K., WINKLER M. E., and ROSENBERG S. M.
Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary phase mutation.
Genes and Development, 1997, 11, 2426-2437.

HEICHMAN K. A., and JOHNSON R. C.
The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer.
Science, 1990, 249, 511-517.

HENDERSON I. R., OWEN P., and NATARO J. P.
Molecular switches-the ON and OFF of bacterial phase variation.
Mol. Microbiol., 1999, 33, 919-932.

HOLLIDAY R.
Epigenetics: An overview.
Dev. Genet., 1994, 15, 453-457.

HOPWOOD D. A., BIBB M. J., CHATER K. F., KIESER T., BRUTON C. J., KIESER H. M., LYDIATE D. J., SMITH C. P., WARD J. M., and SCHREMPF H.
1985, *Genetic Manipulation of Streptomyces-A Laboratory Manual*. The John Innes Institute (Norwich) U. K.

HÜTTER R., and ECKHARDT T.
Genetic manipulation.
in Actinomycetes in Biotechnology edited by M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski, 1988, 89-184.

KEARNEY B., and STASKAWICZ B. J.
Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper.
J. Bacteriol., 1990, 172, 143-148.

KELEMEN G. H., BROWN G. L., KORMANEC J., POTUCKOVA L., CHATER K. F., and BUTTNER M. J.
The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2).
Mol. Microbiol., 1996, 21, 593-603.

LEBLOND P., DEMUYTER P., MOUTIER L., LAAKEL M., DECARIS B., and SIMONET J. M.
Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*.
J. Bacteriol., 1989, 171, 419-423.

LEBLOND P., DEMUYTER P., SIMONET J. M., AND DECARIS B.
Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity.
Mol. Microbiol., 1990a, 4, 707-714.

LEBLOND P., DEMUYTER P., SIMONET J. M., and DECARIS B.
Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region.
J. Bacteriol., 1991, 173, 4229-4233.

LEBLOND P., FISCHER G., FRANCOU F. X., BERGER F., GUERINEAU M., and DECARIS B.
The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA.
Mol. Microbiol., 1996, 19, 261-271.

LEBLOND P., FRANCOU F. X., SIMONET J.M., AND DECARIS B.
Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains.
FEMS Microbiol. Lett., 1990b, 72, 79-88.

LEZHAVA A., MIZUKAMI T., KAJITANI T., KAMEOKA D., REDENBACH M., SHINKAWA H., NIMI O., and KINASHI H.
Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*.
J. Bacteriol., 1995, 177, 6492-6498.

LIN Y. S., KIESER H. M., HOPWOOD D. A., and CHEN C. W.
The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear.
Mol. Microbiol., 1993, 10, 923-933.

LYNN W. H., GENCO C. A., and FORNG R. Y.
Analysis of the insertion characteristics of Tn4351 during high frequency transposition of *Porphyromonas gingivalis*.
NDA J, 1995, 46, 15-17.

MARTIN P., DARY A., ANDRE A., FISCHER G., LEBLOND P., and DECARIS B.
Intraclonal polymorphism in the bacterium *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877: evidence for a high degree of heterogeneity of the wild type clones.
Mutat. Res., 1999, 430, 75-85.

MARTIN P., DARY A., ANDRE A., and DECARIS B.
Identification and typing of *Streptomyces* strains: evalutation of the interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fongerprinting.
Res. Microbiol., In press

MARTIN P., DARY A., and DECARIS B.
Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium *Streptomyces ambofaciens*: characterization of different mutator states.
Mutat. Res., 1998, 421, 73-82.

MATSUSHIMA P., and BALTZ R. H.
A gene cloning system for '*Streptomyces toyocaensis*'.
Microbiology, 1996, 142, 261-267.

MAZODIER P., PETTER R., and THOMPSON C.
Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species.
J. Bacteriol., 1989, 171, 3583-3585.

MEHR I. J., and SEIFERT H. S.
Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair.
Mol. Microbiol., 1998, 30, 697-710.

MODRICH P.
Mechanisms and biological effects of mismatch repair.
Annu. Rev. Genet., 1991, 25, 229-253.

MOLLE V., PALFRAMAN W. J., FINDLAY K. C., and BUTTNER M. J.
WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).
J. Bacteriol., 2000, 182, 1286-1295.

MORONA J. K., MILLER D. C., COFFEY T. J., VINDURAMPULLE C. J., SPRATT B. G., MORONA R., and PATON J. C.
Molecular and genetic charaterization of the capsule biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 23F.
Microbiology, 1999, 145, 781-789.

MOXON E. R., RAINEY P. B., NOWAK M. A., and LENSKY R. E.
Adaptative evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria.
Curr. Biology, 1994, 4, 24-33.

NICHOLSON B., and LOW D.
DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Microbiol., 2000, 35, 728-742.

NODWELL J. R., YANG M., KUO D., and LOSICK R.
Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*.
Genetics, 1999, 151, 569-584.

NOU X., SKINNER B., BRAATEN B., BLYN L., HIRSCH D., and LOW D.
Regulation of pyelonephritis-associated pili phase variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation.
Mol. Microbiol., 1993, 7, 545-553.

OGAWARA H., KASAMA H., NASHIMOTO K., OHTSUBO M., HIGASHI K., and URABE H.
Cloning, sequence and expression of the *arg*G gene from *Streptomyces lavendulae*.
Gene, 1993, 125, 91-96.

OHTA T., UEGUCHI C., and MIZUNO T.
rpoS function is essential for *bgl* silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1999, 181, 6278-6283.

OLASZ F., KISS J., KONIG P., BUZAS Z., STALDER R., and ARBER W.
Target specificity of insertion element *IS30*.
Mol. Microbiol., 1998, 28, 691-704.

OLUKOSHI E. R., and PACKTER N. M.
Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics.
Microbiology, 1994, 140, 931-943.

ORGEL L. E., CRICK F. H., and SAPIENZA C.
Selfish DNA.
Nature, 1980, 25;288, 645-646.

PANDZA K., PFALZER G., CULLUM J., and HRANUELI D.
Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close the ends of the linear chromosome.
Microbiology, 1997, 143, 1493-1501.

PERNODET J. L., BOCCARD F., ALEGRE M. T., GAGNAT J., and GUERINEAU M.
Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA cluster from *Streptomyces ambofaciens*.
Gene, 1989, 79, 33-46.

POTUCKOVA L., KELEMEN G. H., FINDLAY K. C., LONETTO M. A., BUTTNER M. J., and KORMANEC J.
A new RNA polymerase sigma factor, σF, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp.
Mol. Microbiol., 1995, 17, 37-48.

PRIDHAM T. G., ANDERSON P., FOLY C., LINDENFELSER L. A., HESSELTINE C. W., and BENEDICT R. C.
A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*.
Antibiotic Annual, 1956-1957, 947-953.

RAULAND U., GLOCKER I., REDENBACH M., and CULLUM J.
DNA amplifications and deletions in *Streptomyces lividans* 66 and the loss of one end of the linear chromosome.
Mol. Gen. Genet., 1995, 246, 37-44.

RAYSSIGUIER C., THALER D. S., and RADMAN M.
The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants.
Nature, 1989, 342, 396-401.

REDENBACH M., FLETT F., PIENDL W., GLOCKER I., RAULAND U., WAFZIG O., KLIEM R., LEBLOND P., and CULLUM J.
The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions.
Mol. Gen. Genet., 1993, 241, 255-262.

REDENBACH M., KIESER H. M., DENAPAITE D., EICHNER A., CULLUM J., and HOPWOOD D. A.
A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome.
Mol. Microbiol., 1996, 21, 77-96.

RICHARDSON M. A., KUHSTOSS S., HUBER M. L., FORD L., GODFREY O., TURNER J. R., and RAO R. N.
Cloning of spiramycin biosynthetic genes and their use in construting *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in spiramycin biosynthesis.
J. Bacteriol., 1990, 172, 3790-3798.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., and MANIATIS T.
1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y.

SARKARI J., PANDIT N., MOXON E. R., and ACHTMAN M.
Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine.
Mol. Microbiol., 1994, 13, 207-217.

SAUNDERS N. J., PEDEN J. F., HOOD D. W., and MOXON E. R.
Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome.
Mol. Microbiol., 1998, 27, 1091-1098.

SCHAUNER C., DARY A., LEBRIHI A., LEBLOND P., DECARIS B., and GERMAIN P.
Modulation of lipid metabolism and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* unstable mutants.
Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65, 2730-2737.

SCHNEIDER D., AIGL E. B., LEBLOND P., SIMONET J. M., and DECARIS B.
Analysis of genome instability in *Streptomyces ambofaciens*.
J. Gen. Microbiol., 1993, 139, 2559-2567.

SEIFERT H. S.
Questions about gonococcal pilus phase and antigenic variation.
Mol. Microbiol., 1996, 21, 433-440.

STERN A., M. B., NICKEL P., and MEYER T. F.
Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation.
Cell, 1986, 47, 61-71.

STIBITZ S., AARONSON W., MONACK D., and FALKOW S.
Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system.
Nature, 1989, 338, 266-269.

STRAGIER P., and LOSICK R.
Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*.
Annu. Rev. Genet., 1996, 30, 297-341.

SYVANEN M.
The evolutionary implications of mobile genetic elements.
Annu. Rev. Genet., 1984, 18, 271-293.

TROBNER W., and PIECHOCKI R.
Competition between the dam mutator and the isogenic wild-type of *Escherichia coli*.
Mutat. Res., 1985, 144, 145-149.

TUPPER A. E., OWEN-HUGHES T. A., USSERY D. W., SANTOS D. S., FERGUSSON D. J. P., SIDEBOTHAM J. M., HINTON J. C. D., and HIGGINS C. F.
The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*.
Embo J., 1994, 13, 258-268.

VAN DER WOUTE M. W., and LOW D. A.
Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol., 1994, 11, 605-618.

VAN HAM S. M., VAN ALPHEN L., MOOI F. R., and VAN PUTTEN J. P.
Phase variation of *H. influenzae* fimbriae transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region.
Cell, 1993, 73, 1187-1196.

VOLFF J.-N., VIELL P., and ALTENBUCHNER J.
Artificial circularization of the chromosome with concomitant deletion of its terminal inverted repeats enhances genetic instability and genome rearrangements in *Streptomyces lividans*.
Mol. Gen. Genet., 1997, 253, 753-760.

WILLEY J., SCHWEDOCK J., and LOSICK R.
Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*.
Genes and Development, 1993, 7, 895-903.

WU T. H., CLARKE C. H., and MARINUS M. G.
Specificity of *Escherichia coli mutD* and *mutL* mutator strains.
Gene, 1990, 1;87, 1-5.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

RESUME

L'instabilité génétique observée chez *Streptomyces ambofaciens* affecte la pigmentation des colonies ainsi que d'autres caractères comme la sporulation ou la production d'antibiotiques. L'identification des gènes impliqués dans le phénotype dépigmenté s'est longtemps heurtée à l'impossibilité d'utiliser, pour le clonage, des mutants dépigmentés issus de l'instabilité génétique. En effet, la plupart de ces mutants présente des délétions de très grande taille (jusqu'à 25% du génome), associées dans certains cas à l'amplification de séquences d'ADN voisines. Récemment, des mutants dépigmentés issus d'événements mutationnels survenus lors de la différenciation du mycélium aérien ont été caractérisés. Il s'agit des mutants Pig^{-}_{pap}. Ces mutants sont dépigmentés, asporulants et ne présentent pas de délétion de grande taille. De tels mutants pouvaient *a priori* être utilisés comme hôte de clonage pour l'identification de gènes cibles de l'instabilité génétique. La stratégie choisie a consisté à construire une banque d'ADN génomique d'une souche sauvage de *S. ambofaciens* chez *E. coli* et à introduire des plasmides recombinants chez un mutant Pig^{-}_{pap} par conjugaison intergénérique *E. coli-S. ambofaciens* afin de complémenter le phénotype mutant dépigmenté.

Cette approche nécessitait dans un premier temps de disposer d'une souche de phénotype mutant suffisamment stable, capable de conjuguer. La souche WT8p25 a ainsi été choisie comme hôte de clonage. Une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* chez *E. coli* a été réalisée en utilisant comme vecteur le plasmide conjugatif pSET152. 7400 clones ont été repiqués afin de recouvrir l'ensemble du génome de *S. ambofaciens* avec une probabilité de 0,997. De plus, la taille moyenne des inserts est de 8 kb. Une partie de cette banque a été criblée par conjugaison intergénérique *E. coli-S. ambofaciens* WT8p25. Ceci a permis l'isolement de la souche 29C1 présentant un phénotype pigmenté vert alors que celui de la souche sauvage est pigmenté gris. Aucune pigmentation de ce type n'avait été observée jusqu'à présent chez *S. ambofaciens*. La souche 29C1 a été caractérisée d'un point de vue phénotypique et moléculaire. Il a ainsi été observé que cette souche n'est pas restaurée dans la production de spores et est affectée dans son contenu lipidique intracellulaire global. De plus, elle synthétise un composé intracellulaire de nature inconnue et non observé dans la souche sauvage. Enfin, la souche 29C1 possède dans son génome un plasmide recombinant issu de la banque et présente, en plus, une délétion de grande taille associée à une amplification.

Ainsi, ce travail va permettre d'une part d'identifier des gènes cibles de l'instabilité génétique par poursuite du criblage de la banque, et d'autre part d'aborder la relation entre la plasticité génomique et les changements métaboliques qui en résultent chez *S. ambofaciens*.

Mots clés : *S. ambofaciens* ; instabilité génétique ; complémentation fonctionnelle ; conjugaison intergénérique.