



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>

Thèse
présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Génétique Moléculaire

par **Sibel CATAKLI**

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

**Action de facteurs génétiques et environnementaux sur la
dynamique mutationnelle au cours de la différenciation chez
Streptomyces ambofaciens ATCC23877**

Soutenance publique le 12 novembre 2004 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :

Philippe MAZODIER
Marie-Joëlle VIROLLE

Directeur d'unité, Institut Pasteur, Paris 15ème
Chargé de recherche CNRS, Université Orsay, Paris Sud

Examineurs :

Christiane RAYSSIGUIER
Bernard DECARIS
Annie DARY

Professeur, Université de Marne la Vallée
Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy1
Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy1

Composition du jury de thèse

Rapporteurs

❖ **Philippe Mazodier, Directeur d'unité, Institut Pasteur**

Unité de Génétique bactérienne et Différenciation

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux

Paris 15^{ème}

Tél 01 45 68 88 10

Email mazodier@pasteur.fr

❖ **Marie-Joëlle Virolle, Chargé de Recherche CR1, CNRS, Université Orsay**

Laboratoire de Biologie Moléculaire des Actinomycètes

Institut de Génétique et Microbiologie, Bâtiment 400

Université Paris Sud 11

91405 Orsay

Email marie-joelle.virolle@igmors.u-psud.fr

Examineurs

❖ **Christiane Rayssiguier, Professeur à l'Université de Marne la Vallée**

Laboratoire d'informatique de Gaspard-Monge

Bâtiment Copernic

5, Bd Descartes, Champs-sur-Marne

77454 Marne-la-Vallée

Tél 01 60 96 77 21

Email christiane.rayssiguier@univ-mlv.fr

❖ **Bernard Decaris, Professeur à l'Université Henri Poincaré (Directeur du laboratoire et co-directeur de thèse)**

UMR INRA/UHP 1128-IFR 110 Laboratoire de Génétique et Microbiologie

Faculté des Sciences et Techniques

Boulevard des Aiguillettes BP 239

54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tél 03 83 68 42 12

Email decaris@nancy.inra.fr

❖ **Annie Dary, Professeur à l'Université Henri Poincaré (co-directeur de thèse)**

EA 3449 UC INRA 885 Laboratoire de BioSciences de l'Aliment

Faculté des Sciences et Techniques

Boulevard des Aiguillettes BP 239

54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tél 03 83 68 42 67

Email dary@scbiol.uhp-nancy.fr

Merci Monsieur le Professeur Bernard Decaris de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, de la confiance que vous m'avez témoignée et pour toutes vos critiques constructives.

Merci Annie pour ton encadrement et ton soutien de tous les instants.

Merci Monsieur le Docteur Philippe Mazodier et Madame le Docteur Marie-Joëlle Virolle d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci Madame le Professeur Christiane Rayssiguier d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci Magali pour ta dynamique et ta bonne humeur permanente. Tous les moments de complicité passés avec toi seront inoubliables. Je te souhaite beaucoup de succès dans ta carrière et dans la suite de la caractérisation des papilles !

Merci Axelle pour ta gentillesse, ta sympathie et ta sagesse.

Merci à vous deux pour votre participation considérable, sérieuse et appliquée dans ce travail !

Merci Vincent pour tous tes conseils judicieux.

Merci aux beloteurs du midi (ils se reconnaîtront !) pour tous ces moments de détente et de rire. A consommer sans modération (évidemment, en dehors des heures de travail !). Je vous souhaite beaucoup de capots tout au long de votre carrière.

Merci Nico de m'avoir soutenue pendant ces quelques années et pour tous tes conseils scientifiques.

Merci à toutes les personnes du labo qui ont été sincères avec moi et qui ont su manifester de l'intérêt pour mon travail.

Merci à tous mes proches et plus particulièrement papa, maman, Selin, Christophe et Chipie d'avoir toujours été présents et pour tout l'amour qu'ils m'apportent. Je vous adore.

Merci bébé. Tu as su me redonner goût à la vie. Je suis la plus heureuse des femmes grâce à toi, une femme comblée par ta présence à mes côtés et par le fruit de notre amour que je porte. Kévin, je t'aime.

Activités de recherche

Publications :

❖ **Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.**

The spontaneous amplification of a sequence of the TIR is associated with the circularization of the chromosome in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Archives of Microbiology 2003 (179) 387-93.

❖ **Catakli S., Andrieux A., Decaris B. et Dary A.**

The sigma factor WhiG and its regulation are affected by a mutational phenomenon taking place during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

❖ *Acceptée pour Research in Microbiology*

Communications orales :

❖ **Catakli S., André A., Decaris B. et Dary A.**

Les papilles dépigmentées produites au cours du développement chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 sont des mutants *whi*.

Rencontre du club des Actinomycètes, Nancy, 6-7 mai 2002.

❖ **Catakli S., Andrieux A., Decaris B. et Dary A.**

A mutational phenomenon affecting the regulation of the WhiG sigma factor takes place during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Biology of Streptomyces and related Actinomycetes, Münster (Germany), 27 février- 3 mars 2003.

❖ **Genay M., Catakli S., Decaris B. et Dary A.**

Modulation de l'instabilité génétique au cours du développement de *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces coelicolor* par les nutriments.

Rencontre du club des Actinomycètes, Liège, 6-7 mai 2004.

Affiches :

❖ **Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.**

Identification d'une nouvelle séquence amplifiable localisée aux extrémités du chromosome de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Colloque 3R (Réplication-Recombinaison-Réparation), Gif sur Yvette, juin 2001.

❖ **Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.**

Identification of a new amplifiable unit of DNA located in the Terminal Inverted repeats of the chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

ISBA, Vancouver (Canada), août 2001.

❖ **Catakli S., André A., Decaris B. et Dary A.**

Genetic instability events occurring during the development of the colony produce at high frequency a particular class of Whi mutants in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

International congress of bacteriology, Paris, juin 2002.

SOMMAIRE

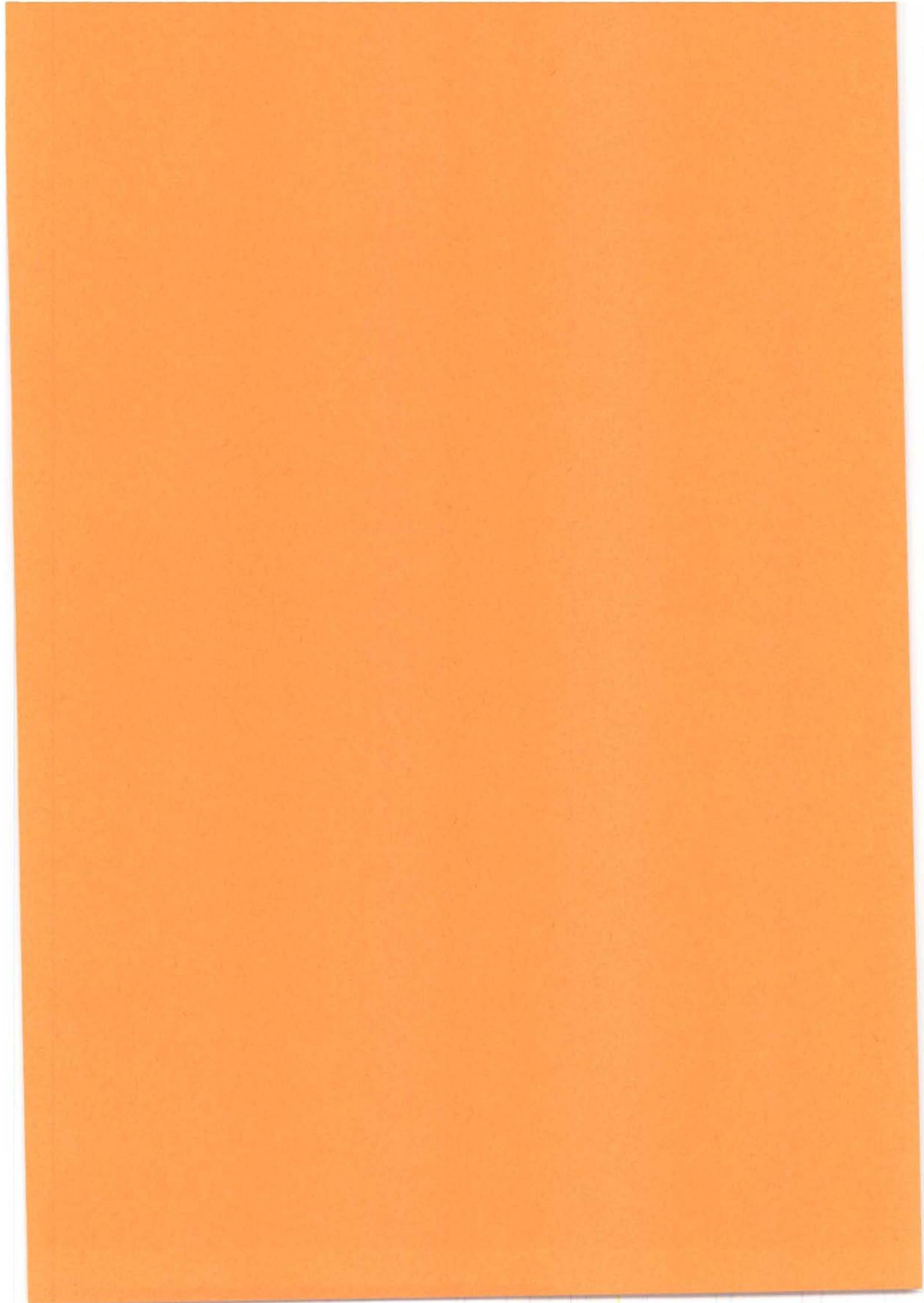
I. INTRODUCTION	1
1. LES MUTATIONS: SOURCE DE DIVERSITE GENETIQUE	4
1.1. <i>Concept et types de mutation</i>	4
1.2. <i>Les mutations sont créatrices de diversité génétique</i>	5
1.2.1. Impact des différents types de mutations dans la diversité des populations bactériennes	5
1.2.2. Concept et nature de la diversité intraspécifique	9
2. MECANISME DE SURVIE : UN ETAT MUTATEUR	11
2.1. <i>Concept de mutateur</i>	11
2.2. <i>Mécanismes responsables d'un état mutateur héritable</i>	12
2.2.1. Les systèmes de correction pendant la réplication de l'ADN	12
2.2.2. Les systèmes de correction post-réplivative de l'ADN	13
2.2.2.1. Le système MMR	13
2.2.2.2. Le système d'excision des bases endommagées	16
2.2.2.3. Le système de réparation oxydative	17
2.2.3. La recombinaison	19
2.2.4. La transcription	20
2.2.5. La traduction	21
2.2.6. Conclusion	21
2.3. <i>Etat mutateur transitoire</i>	23
2.3.1. Induction d'un état mutateur transitoire par le système SOS	23
2.3.2. Induction d'un état mutateur transitoire en conditions de non croissance	25
2.3.3. Induction d'un état mutateur transitoire par la réponse stringente	25
2.4. <i>Etat mutateur et impact évolutif</i>	27
3. MECANISME DE SURVIE : LES LOCI MUTABLES	29
3.1. <i>Concept de loci mutables et gènes de contingence</i>	29
3.2. <i>Mécanismes impliqués dans la mutabilité de gènes de contingence</i>	30
3.2.1. La transposition spécialisée	30
3.2.2. Le transfert horizontal	31
3.2.3. La méthylation et la modification de la conformation de l'ADN	32
3.2.4. La recombinaison	33
3.2.4.1. La recombinaison homologue	33
3.2.4.2. La recombinaison site-spécifique	34
3.2.4.3. La recombinaison non homologue	36
3.3. <i>Les loci mutables et les réarrangements génomiques</i>	38
3.4. <i>Les loci mutables et leur impact évolutif</i>	38
4. UNE STRATEGIE DE SURVIE : VARIATION DE L'EXPRESSION GENIQUE	40
4.1. <i>Rôle du ppGpp dans la modulation de l'expression génique</i>	40
4.2. <i>Rôle des facteurs sigma dans la modulation de l'expression génique</i>	42
4.2.1. Facteurs sigma, anti-sigma, anti-anti-sigma	42
4.2.1.1. Les facteurs sigma	42
4.2.1.2. Les facteurs anti-sigma et anti-anti-sigma	46
4.2.2. Rôle des facteurs sigma dans la réponse aux stress	47

4.2.3.	Rôle des facteurs sigma dans la sporulation	48
4.2.4.	Rôle du ppGpp dans la compétitivité entre facteurs sigma	50
4.3.	<i>La mort cellulaire programmée : un mécanisme de survie</i>	50
4.3.1.	Le concept de mort cellulaire programmée.....	50
4.3.2.	La mort cellulaire programmée au cours du développement des bactéries	52
4.3.2.1.	Lors de la sporulation.....	52
4.3.2.2.	Lors du développement du corps de fructification	53
4.3.2.3.	Lors de la formation d'un biofilm	53
4.3.2.4.	Changement morphologique spécifique	54
4.3.3.	Aspects génétiques de la mort cellulaire programmée.....	54
5.	OBJECTIF DU TRAVAIL : RECHERCHE DU CONTROLE GENETIQUE CHEZ <i>STREPTOMYCES AMBOFACIENS</i> VIA L'ETUDE DE GENES MUTABLES	56
5.1.	<i>Aspects morphologiques et physiologiques des Streptomyces</i>	56
5.1.1.	Cycle de développement complexe sur milieu solide	56
5.1.2.	Les mutants affectés dans la différenciation morphologique	57
5.1.3.	Les gènes <i>whi</i> impliqués dans le processus de sporulation	58
5.2.	<i>Instabilité génétique décrite chez les Streptomyces</i>	60
5.3.	<i>La pigmentation est un caractère instable chez S. ambofaciens</i>	60
5.4.	<i>Mise en place d'un état mutateur lors de la différenciation du mycélium aérien</i>	61
5.5.	<i>Problématiques abordées</i>	62
II.	RESULTATS	65
1.	CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET MOLECULAIRE DE LA SOUCHE 29C1	71
1.1.	<i>Isolement de la souche 29C1</i>	71
1.2.	<i>Analyse phénotypique de la souche 29C1</i>	73
1.3.	<i>Structure chromosomique de la souche 29C1</i>	74
1.3.1.	Présence d'un plasmide recombinant dans le génome de 29C1	74
1.3.2.	Le chromosome de 29C1 porte une amplification	74
1.3.2.1.	Localisation de l'amplification.....	74
1.3.2.2.	Stabilité de l'amplification	76
1.3.3.	Le chromosome de 29C1 est délété	77
1.3.4.	Le chromosome de 29C1 serait circulaire.....	77
1.4.	<i>Article n°1</i>	80
2.	ETUDE DES MUTANTS PIG-PAP, MUTANTS PRODUITS AU COURS DE LA DIFFERENCIATION MORPHOLOGIQUE CHEZ <i>S. AMBOFACIENS</i>	93
2.1.	<i>Les mutants Pig-pap sont des mutants whi</i>	93
2.1.1.	Isolement des mutants Pig-pap	93
2.1.2.	Taux de réversion du phénotype mutant Pig-pap vers le phénotype sauvage	93
2.1.3.	Les mutants Pig-pap ne sporulent pas.....	94
2.1.4.	Les mutants Pig-pap présentent un phénotype « <i>whiG-like</i> »	94
2.2.	<i>Etude du déterminisme génétique des mutants Pig-pap</i>	96
2.2.1.	Complémentation du phénotype mutant Pig-pap	96
2.2.1.1.	Clonage des gènes <i>whi</i> dans le plasmide conjugatif et intégratif pSET152.....	96

2.2.1.2.	Complémentation des trois mutants Pig-pap.....	99
2.2.2.	Le gène <i>whiG</i> est-il muté chez les mutants Pig-pap ?.....	101
2.2.3.	Le gène <i>whiG</i> est-il transcrit chez les mutants Pig-pap ?.....	103
2.2.3.1.	Analyse transcriptionnelle de <i>whiG</i> par RT-PCR et suivi de la transcription de <i>whiG</i> au cours du temps	103
2.2.3.2.	Analyse transcriptionnelle de <i>whiG</i> par RT-PCR quantitative.....	105
2.2.4.	Le gène <i>whiH</i> n'est pas transcrit chez les mutants Pig-pap.....	108
2.3.	<i>Le transgène whiG est une cible mutationnelle chez les mutants Pig-pap</i>	109
2.3.1.	Caractérisation phénotypique des mutants issus du transconjugant.....	109
2.3.2.	Caractérisation moléculaire des mutants issus du transconjugant.....	109
2.4.	<i>Etude des mutants issus de papilles chez S. coelicolor</i>	111
2.4.1.	Caractérisation phénotypique et moléculaire des trois mutants PC1, PC2 et PC3.....	111
2.4.2.	Introduction de pSET152(<i>whiG</i>) par conjugaison dans les trois mutants PC1, PC2 et PC3.....	112
2.4.3.	Analyse moléculaire du gène <i>whiG</i> chez les trois mutants PC1, PC2 et PC3.....	113
2.5.	<i>Article n°2</i>	115
3.	MODULATION DE LA PRODUCTION DE MUTANTS PIG-PAP PAR LA REPOSE STRINGENTE.....	159
3.1.	<i>Recherche d'éléments nutritifs influençant la production de papilles blanches</i>	159
3.2.	<i>Caractérisation phénotypique et moléculaire de mutants Pig-pap issus de milieux « carencés »</i> 165	
3.3.	<i>Etude du mutant relA de S. coelicolor</i>	168
III.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	173
1.	DYNAMIQUE DES STRUCTURES CHROMOSOMIQUES ET IMPACTS PHYSIOLOGIQUES DES REMANIEMENTS	177
1.1.	<i>Impact des réarrangements sur la structure du chromosome de S. ambofaciens</i>	177
1.1.1.	Nature et régio-spécificité des réarrangements chromosomiques chez <i>S. ambofaciens</i>	177
1.1.2.	Mise en évidence d'une nouvelle région amplifiable : l'AUD37.....	179
1.1.3.	Les différentes structures chromosomiques caractérisées.....	180
1.1.4.	Mécanismes moléculaires impliqués dans les réarrangements chromosomiques.....	183
1.1.5.	Stabilité des chromosomes remaniés.....	186
1.2.	<i>Impacts physiologiques des remaniements chromosomiques chez S. ambofaciens</i>	187
1.2.1.	Réarrangements chromosomiques et production d'antibiotiques.....	187
1.2.2.	Existe-t-il une relation entre l'AUD37 amplifiée chez la souche 29C1 et le cluster <i>alp</i> ?.....	188
2.	ETUDE DE LA DYNAMIQUE MUTATIONNELLE AU COURS DE LA DIFFERENCIATION MORPHOLOGIQUE CHEZ <i>S. AMBOFACIENS</i>	193
2.1.	<i>Les mutants Pig-pap : un nouvel aspect de l'instabilité génétique</i>	193
2.2.	<i>Recherche de la nature moléculaire des mutants Pig-pap</i>	194
2.2.1.	Caractéristiques des mutants Pig-pap étudiés.....	194
2.2.2.	Le facteur σ^{WhiG} ne serait pas fonctionnel chez les mutants Pig-pap.....	195
2.2.2.1.	Mécanismes de régulation de l'activité des facteurs σ	196
2.2.2.2.	Hypothèses sur le mode de régulation du facteur σ^{WhiG} chez Streptomyces.....	200
2.2.2.3.	Hypothèses sur la nature moléculaire du déterminisme du phénotype Pig-pap.....	202
2.3.	<i>Une mutabilité ciblée?</i>	206
3.	MODULATION DE LA DYNAMIQUE MUTATIONNELLE CHEZ <i>S. AMBOFACIENS</i>	208

3.1.	<i>Les mutants Pig-pap sont issus de niveaux variés d'instabilité génétique</i>	208
3.1.1.	Notion d'état mutateur.....	208
3.1.2.	Hypothèses sur la nature de l'état mutateur chez les mutants Pig-pap.....	209
3.2.	<i>Induction de la mutabilité par une carence en nutriments</i>	210
3.2.1.	La réponse stringente est impliquée dans la formation de papilles blanches sur les colonies	210
3.2.2.	Hypothèses sur la nature de la relation entre réponse stringente et mutabilité.....	210
4.	PERSPECTIVES GENERALES ET CONCLUSION	214
IV.	REFERENCES	215
V.	ANNEXES	249

I. INTRODUCTION



Dans la nature, les microorganismes peuvent être soumis à des variations environnementales telles que des changements physiques comme la température ou la pression osmotique, ou des changements chimiques, notamment les agents toxiques ou les carences alimentaires. La survie et la capacité de reproduction de l'individu dans ces nouveaux environnements et celles de l'espèce dans une communauté de microorganismes est assurée par l'existence d'une grande variété de mécanismes pouvant être regroupés en deux classes. La première classe comprend les mécanismes qui permettent à l'organisme de moduler ou de modifier son métabolisme suite à la variation environnementale *via* une cascade de régulation de l'expression de certains gènes. La deuxième classe regroupe les mécanismes qui permettent la diversification des génomes dans une population. Cette diversité génétique ainsi créée et la modulation de l'expression génique permettent la survie d'une population par la sélection naturelle des organismes les plus adaptés dans un environnement donné.

Les mutations, y compris les réarrangements génomiques, constituent la source de la diversité génétique nécessaire à l'adaptation des microorganismes à leur environnement et à l'évolution des espèces. Le taux de mutation est modulable entre individus d'une même population ou entre populations d'une même espèce. Par ailleurs, au sein d'un individu, il n'est pas constant en différents endroits du génome. Il existe ainsi des mécanismes qui augmentent le taux de mutation général du microorganisme et permettent à celui-ci de se trouver dans un état dit mutateur. En outre, le taux de mutation est plus élevé dans certaines régions du génome, appelées loci mutables, sans spécialement faire appel à un état mutateur généralisé.

La description de l'hypermutabilité, des divers mécanismes impliqués et indispensables à la création du polymorphisme génétique de l'espèce et donc à l'adaptation de l'espèce lors de certaines carences vont permettre d'introduire l'objectif du travail présenté dans ce mémoire. La thématique étudiée concerne la dynamique mutationnelle du génome de la bactérie Gram⁺ à haut pourcentage en G+C et productrice d'antibiotiques, *Streptomyces ambofaciens*. Cette dynamique mutationnelle correspond à la modulation de la régulation de certains gènes ou à la formation de réarrangements chromosomiques à haute fréquence. Elle peut être affectée par des facteurs génétiques et par des facteurs environnementaux lors de carences nutritives.

1. Les mutations: source de diversité génétique

1.1. Concept et types de mutation

Le génome est soumis à deux grandes forces, en apparence antagonistes, l'une conduisant à sa stabilité et l'autre à sa dynamique. La stabilité de l'information génétique résulte de la réplication semi-conservative de l'ADN et de l'activité de divers systèmes enzymatiques de réparation, capables de corriger les modifications de bases et les erreurs post-répliquatives au sein de cette molécule. Cependant, cette stabilité génétique n'est qu'apparente car l'information génétique est l'objet de modifications permanentes appelées mutations. Ces mutations peuvent soit affecter la séquence d'un gène soit faire varier l'organisation du génome par réarrangement de segments chromosomiques. Le génome est donc une structure dynamique avec de nombreux changements. Les effets des mutations sur le phénotype varient à partir de ceux qui sont imperceptibles à ceux qui modifient radicalement le phénotype.

Les mutations peuvent être regroupées en trois catégories. La première implique des changements locaux qui affectent la séquence d'un gène et correspond aux mutations géniques. Il s'agit de substitutions, d'insertions ou de délétions d'un ou plusieurs nucléotides ou d'inversions d'une courte séquence. La deuxième comprend les mutations chromosomiques qui sont caractérisées par la perte, le gain ou le réarrangement de segments chromosomiques et qui modifient ainsi la structure du chromosome. Ces mutations incluent les duplications, les amplifications de séquences, les inversions et les délétions de grands segments chromosomiques. Enfin, la troisième, qui peut être considérée comme une mutation de type chromosomique, est basée sur le transfert horizontal de gènes et donc sur l'acquisition potentielle de nouvelles caractéristiques. Cette acquisition d'information génétique, qui conduit à des insertions et remplacements par perte de séquences, résulte très souvent d'échanges de matériel génétique entre bactéries. Ces différentes mutations qui ont été identifiées et décrites en conditions de laboratoire sont en fait très fréquentes dans l'environnement et créatrices de diversité génétique.

1.2. Les mutations sont créatrices de diversité génétique

1.2.1. Impact des différents types de mutations dans la diversité des populations bactériennes

La substitution de bases est le processus évolutif le plus graduel et le plus lent. En effet, si une mutation dans une région du gène correspondant au site actif d'une enzyme peut avoir un impact immédiat, la probabilité de modifier une fonction existante en une seule substitution, se produisant aléatoirement, est relativement faible. Il faut souvent un grand nombre de substitutions pour aboutir à une nouvelle fonction biologique (Arber, 1993).

Par contre, de nouvelles fonctions peuvent être créées dans un génome par duplication de gènes. L'accumulation de mutations peut alors aboutir à la création de nouvelles fonctions assurées par l'une des deux copies du gène dupliqué. Ainsi, chez *Escherichia coli*, l' α -lactalbumine et le lysozyme de type C sont des protéines de fonctions très différentes mais ont des structures homologues. Ces deux protéines seraient donc issues de gènes résultant de la duplication et qui auraient divergés (Kumagai *et al.*, 1992). Par ailleurs, une structure chromosomique originale pour un chromosome bactérien a été décrit chez un mutant de *Streptomyces ambofaciens* (Wenner *et al.*, 2003). Le chromosome de ce mutant a une taille approximative de 13 Mb alors que celui du sauvage présente environ 8 Mb. Cette structure résulte d'une fusion de deux chromosomes linéaires partiellement délétés dans le même bras chromosomique. Ainsi, le mutant caractérisé chez *S. ambofaciens* présente de nombreux gènes dupliqués au sein de son génome et, en terme d'évolution, ces duplications pourraient favoriser l'apparition de nouvelles fonctions. Par ailleurs, Wolfe et Shields suggèrent que la structure génomique actuelle de *Saccharomyces cerevisiae* dériverait d'une duplication entière du génome ancestral aboutissant à la tétraploïdie de l'organisme accompagnée de délétions ultérieures (Wolfe & Shields, 1997). De plus, des résultats récents indiquent que pour 95 % des gènes dupliqués, un des deux gènes garde la fonction ancestrale et l'autre code une nouvelle fonction (Kellis *et al.*, 2004). Cet organisme représente donc un modèle d'évolution rapide par duplication de gènes.

L'amplification de certains gènes constitue une mutation qui conduit souvent à leur surexpression et qui peut être sélectionnée. Le caractère instable d'une amplification peut conduire soit au retour à l'état initial, par recombinaison homologue entre les copies répétées, soit à un état intermédiaire avec un nombre de copies réitérées variable. Ainsi, l'amplification de certains gènes comme ceux de résistance aux antibiotiques peut être maintenue dans une population pendant un certain temps puis peut être modulée voire éliminée (Romero & Palacios, 1997). En outre, l'amplification d'une séquence augmente la probabilité qu'une mutation se produise dans une copie réitérée. Ainsi, par la réversibilité de l'amplification et par conséquent après perte de l'amplification, l'allèle muté peut être sélectionné et fixé dans la population (Romero & Palacios, 1997). L'amplification de séquence pourrait d'ailleurs être impliquée dans le phénomène de mutabilité en phase stationnaire. Des mutants β -gal peuvent réverter et être ainsi sélectionnés sur milieu contenant du lactose comme unique source de carbone. L'hypothèse d'une réversion d'une mutation frameshift dans le gène codant la β -galactosidase avait été postulée (Cairns & Foster, 1991). Des résultats récents suggèrent en fait que la mutabilité de ce gène résulterait de l'état d'amplification de ce gène lors de la culture des bactéries Lac- sur milieu de sélection. Ce postulat serait basé sur deux faits. Premièrement, si le locus muté présente une expression résiduelle de l'activité, son taux d'expression est d'autant plus fort que le nombre de réitération de ce locus est élevé. Deuxièmement, des événements de réversion peuvent avoir lieu plus fréquemment si le locus est présent en plusieurs copies. Ces événements peuvent ensuite être sélectionnés par la bactérie pour s'adapter et croître sur le milieu de sélection (Andersson *et al.*, 1998).

D'autres types de réarrangements chromosomiques constituent également des mécanismes d'évolution rapide. Ces réarrangements peuvent modifier des fonctions particulières notamment par fusion de gènes, en plaçant un gène sous le contrôle d'une nouvelle région promotrice ou en modifiant l'organisation du génome. Ainsi, en comparant les cartes de restriction du génome de différentes espèces ou souches d'une même espèce, des événements d'inversion ont été mis en évidence. Ils peuvent résulter soit d'événements de recombinaison homologue entre séquences répétées de type *rrn* ou IS soit d'événements de recombinaison non homologue (Daveran-Mingot *et al.*, 1998; Gibbs & Meyer, 1996; Rocha & Blanchard, 2002; Stibitz & Yang, 1999). Par exemple, il a été montré que près de la moitié du chromosome de *Salmonella paratyphi* avait subi une inversion par rapport à celui de *Salmonella typhimurium*. Ceci résulte d'une recombinaison entre deux gènes *rrn* (Liu & Sanderson, 1995).

L'accumulation de mutations ponctuelles ou les événements de réarrangements génomiques ne peuvent à eux seuls rendre compte de la capacité qu'ont les bactéries d'exploiter de nouveaux environnements. En effet, la grande diversité observée au sein de certaines espèces bactériennes résulte probablement en grande partie de l'acquisition de gènes par transfert horizontal. Par exemple, la distinction entre *E. coli* et l'espèce phylogénétiquement très proche *Salmonella enterica* ne peut être expliquée par une évolution par mutations ponctuelles des gènes communs à ces deux espèces mais plutôt par une suite d'événements de transfert horizontal (Lawrence & Ochman, 1998). Le taux de gènes échangés dans certains génomes bactériens totalement séquencés a été estimé en analysant quelques caractéristiques de leur séquence telles que la composition en G+C ou l'utilisation différentielle de codons (Ochman *et al.*, 2000). Ce taux varie de 0 % pour les bactéries intracellulaires, c'est-à-dire vivant dans un environnement limité en ADN donneur, comme *Mycoplasma genitalium* ou *Borrelia burgdoferi*, à 12,8 % pour *E. coli* et 16 % pour *Synechocystis* PCC6803 (Ochman *et al.*, 2000). Par ailleurs, il est à noter que ces pourcentages sont très sous-estimés étant donné que les événements de transfert de gènes présentant un pourcentage en G+C similaire au génome receveur ou une utilisation similaire des codons ne sont pas décelables par ce type d'analyse. Ainsi, une grande majorité des génomes bactériens porte des gènes issus d'ancêtres différents et acquis par transfert horizontal. Ces gènes sont souvent échangés par bloc de gènes et sont dans certains cas des îlots de pathogénicité. La taille de ces îlots est variable mais est en général grande. Par exemple, l'îlot de pathogénicité nommé SPI-3 de 17 kb a été transféré et intégré dans le génome de *S. enterica* et celui de 70 kb nommé PAI chez une souche pathogène d'*E. coli* (Ochman *et al.*, 2000). Un îlot symbiotique de 500 kb, portant des gènes impliqués dans la nodulation et la fixation d'azote, a été transféré chez *Mesorhizobium loti* (Ochman *et al.*, 2000). Par ailleurs, plusieurs îlots de pathogénicité peuvent être présents sur un même génome (Ochman *et al.*, 2000). Ainsi, par des événements de recombinaison, ces îlots, pouvant être qualifiés d'instables, sont source de plasticité génomique (Middendorf *et al.*, 2004). Chez la souche *E. coli* 536, au moins cinq îlots de pathogénicité (PAI I à PAI V) ont été mis en évidence sur le chromosome (Middendorf *et al.*, 2004). La fréquence de délétion de chacun de ces îlots a été estimée. Avec une fréquence respective de $2 \cdot 10^{-5}$ et $5 \cdot 10^{-5}$, les îlots PAI II et PAI III sont les plus instables. Les îlots PAI I et PAI V s'excisent à une fréquence respective de $2 \cdot 10^{-6}$ et $1 \cdot 10^{-6}$ alors que l'îlot PAI IV est relativement stable. La stabilité de ce dernier est expliquée par l'absence de répétitions directes aux extrémités (Middendorf *et al.*, 2004). De plus, la délétion de PAI II et PAI III est induite par des stimuli environnementaux

telle la variation de température. Tandis que l'excision de PAI I, PAI II et PAI V requiert une recombinaison site-spécifique utilisant les petites répétitions directes situées aux extrémités de leurs séquences, celle de PAI III peut avoir lieu soit par recombinaison site-spécifique soit par recombinaison homologue entre deux IS (Middendorf *et al.*, 2004). Ainsi, le génome d'*E. coli* peut être modulé par délétion d'îlots de pathogénicité.

La nature des gènes échangés entre organismes est très variée. Des gènes du métabolisme, de dégradation, de détoxification, de résistance, de virulence, du système de restriction-modification ou encore des gènes de biosynthèse des exopolysaccharides ont été échangés entre populations bactériennes (Bourgoin *et al.*, 1999; Burrus *et al.*, 2001; Davison, 1999; Groisman & Ochman, 1997; Stevens *et al.*, 1990). Cependant, tous les gènes ne sont pas de bons candidats au transfert horizontal. Les gènes dits variables ou certains gènes de contingence, présents uniquement dans certaines souches ou certaines espèces et conférant un avantage à l'individu seulement dans certaines conditions, semblent pouvoir être échangés plus efficacement au sein de diverses espèces et genres bactériens (Lawrence & Ochman, 1997). Ces gènes constitueraient donc une sorte de « pool » de gènes pouvant être partagés, échangés entre ces organismes.

Ainsi, les transferts horizontaux participent activement et rapidement à l'acquisition de nouvelles fonctions par une bactérie. Lawrence et Roth suggèrent que le mécanisme d'acquisition de gènes, associé à des délétions, serait à l'origine de la spéciation chez les bactéries (Lawrence and Roth, 1999). En effet, si une séquence transférée et intégrée dans le génome de la bactérie réceptrice apporte un avantage à celle-ci dans des conditions environnementales particulières, alors ce fragment d'ADN acquis sera immédiatement sélectionné au détriment d'une séquence endogène dont l'avantage sélectif sera plus faible que la séquence transférée et qui sera ainsi perdue par délétion. Ainsi, l'adaptation des bactéries à une modification de leur milieu ou à un nouvel environnement est souvent due à une acquisition de fonctions nouvelles suite à un transfert horizontal. Le transfert horizontal présente donc un fort impact dans l'évolution et l'adaptation des espèces.

1.2.2. Concept et nature de la diversité intraspécifique

Les modifications ou les échanges d'information génétique peuvent impliquer des individus appartenant à des espèces différentes ou des genres différents, créant ainsi une diversité intraspécifique et à terme interspécifique, ou à des souches appartenant à la même espèce, créant dans ce cas une diversité intraspécifique. Par ailleurs, une diversité intraclonale, visualisable au niveau phénotypique ou génotypique, a également été mise en évidence chez de nombreuses souches bactériennes.

Le concept même d'espèce bactérienne sous-entend une diversité génétique entre les différents individus de l'espèce. Actuellement, un des paramètres permettant de classer des souches dans une espèce est l'hybridation ADN /ADN. Deux souches appartiennent à la même espèce si elles présentent au moins 70 % d'identité. Ainsi, 30 % de divergence peuvent exister entre souches d'une espèce donnée. Cette divergence peut impliquer la taille et/ou la structure du génome et/ou une modification de la séquence du génome et/ou la présence d'éléments extrachromosomiques. Cependant, certaines espèces bactériennes sont présentées comme qualifiées de monomorphes. C'est le cas par exemple de *Bacillus anthracis*. Cette espèce fait partie tout comme *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis* du groupe des bacilles. Des comparaisons de profils de macrorestriction obtenus en PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) et en AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont permis de montrer une diversité génétique importante entre différents isolats de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Contrairement à ces deux espèces, les différents isolats de *B. anthracis* ne sont pas différenciables par ce type d'analyse (Radnedge *et al.*, 2003). Cette espèce serait un clone et serait ainsi qualifiée d'espèce monomorphique. Une variabilité est quand même décelable en analysant des régions avec un nombre de répétitions en tandem pouvant varier (Hill *et al.*, 2004). Il est suggéré que cette espèce serait un dérivé d'une souche de *B. cereus* ayant acquis par transfert horizontal deux plasmides virulents (Hill *et al.*, 2004). Ainsi, la classification de certaines espèces bactériennes telle *B. anthracis* serait à redéfinir.

La variabilité génétique est notamment due à l'insertion de séquences d'ADN telles que les plasmides, les phages ou les transposons (Schmidt *et al.*, 1996). Les souches de *Leptospira interrogans* possèdent un chromosome circulaire dont la taille varie entre 3850 kb et 5450 kb. Les auteurs suggèrent que cette variabilité pourrait être due à la présence de séquences répétées et de plasmides (Saint Girons *et al.*, 1992). Par ailleurs, une diversité importante impliquant l'organisation du génome peut être observée. En effet, de nombreuses séquences d'insertions et séquences répétées provoquant des réarrangements chromosomiques ont été mises en évidence dans le génome d'*Helicobacter pylori* (Jiang *et al.*, 1996). De plus, l'analyse du contenu en bases G+C dans le génome de cette bactérie a montré que le transfert horizontal pouvait être également à l'origine du polymorphisme observé au sein de cette espèce (Bjorkholm *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 1998). Chez *S. typhimurium*, les souches sauvages d'origines différentes présentent 21 organisations chromosomiques différentes. Cette diversité est le résultat d'événements de recombinaison homologue s'étant produits entre opérons ribosomiques (Liu & Sanderson, 1996). Par ailleurs, les souches de *B. burgdorferi* contiennent une variété d'éléments extrachromosomiques, linéaires ou circulaires dont la taille varie de 8,4 kb à 300 kb (Saint Girons *et al.*, 1992). Il a été identifié, pour 208 souches de *Vibrio vulnificus*, une relation entre la diversité intraspécifique et les variations environnementales, et plus particulièrement la température. Ce polymorphisme a été déterminé par comparaison de profils obtenus par la technique de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) en estimant l'indice de diversité génétique des isolats prélevés chaque mois. Ainsi, mis à part le fait qu'aucune souche ne soit détectée en hiver (de décembre à février), il a été montré que l'indice de diversité génétique des souches isolées en mars était de 0,9167 alors qu'une diversité intraspécifique plus importante (de 0,9933) a été estimée pour les souches isolées au mois d'avril (Lin *et al.*, 2003).

Ainsi, la création de diversité génétique est un phénomène omniprésent. Dans la très grande majorité des cas, une variabilité intraspécifique ou intraclonale caractérise les espèces bactériennes.

2. Mécanisme de survie : un état mutateur

Le taux de mutation peut varier entre individus d'une même espèce ou entre populations d'une même espèce. En effet, dans certaines conditions environnementales, ou après mutations de certains gènes, le taux de mutation de certains gènes peut être augmenté. La cellule est alors dans un état qualifié de mutateur qui peut être transitoire ou acquis, c'est-à-dire transmis à la descendance pendant de nombreuses générations. L'établissement d'un tel état permet, au sein d'une population bactérienne, la diversification des populations et donc, à terme, des espèces.

2.1. Concept de mutateur

Chez les bactéries, les mutants avec un phénotype mutateur [Mut^-] présentent une fréquence relative de mutations spontanées plus élevée que le sauvage [Mut^+]. La recherche des mécanismes de contrôle de l'intégrité du génome ont amené à rechercher des mutants avec des taux élevés de mutations. Ces mutateurs ont été trouvés soit par leur existence préalable dans une collection de souches soit après un traitement mutagénique en les sélectionnant sur une fréquence de réversion plus élevée pour un marqueur d'auxotrophie, d'apparition de résistants à un antibiotique ou de réversion du phénotype Lac^- vers Lac^+ (Horst *et al.*, 1999).

Lors de la mise en place d'un état mutateur généralisé, la fréquence de mutations de l'ensemble des gènes est augmentée. Dans la majorité des cas, des mutations dans les gènes mutateurs conduisent à l'apparition de mutations ponctuelles ou de réarrangements chromosomiques tels que des délétions. La fréquence des mutations qui se produisent pendant les processus de réparation des modifications de l'ADN est 100 à 1000 fois augmentée dans les cellules déficientes pour les fonctions de réparation post-réplivative et notamment pour les gènes *mutD*, *mutHLS*, *uvrD* ou pour les fonctions de réparation des guanines oxydées et notamment pour les gènes *mutM*, *mutY* ou *mutT*. Par ailleurs, à travers la génération de telles mutations des mutateurs, les mutateurs peuvent acquérir plus facilement de nouveaux gènes puisque l'inactivation du système MMR réduit les barrières de recombinaison entre séquences homéologues d'origines diverses (Miller, 1998).

Des mutants dits antimutateurs ont également été isolés. Ces mutants présentent, contrairement aux mutateurs, un taux de mutations spontanées plus faible que celui de la souche sauvage (Dzidic & Petranovic, 2003; Schaaper, 1998). Ainsi, l'existence de gènes mutateurs et antimutateurs suggère que le taux de mutations spontanées est génétiquement déterminé.

2.2. Mécanismes responsables d'un état mutateur héritable

La caractérisation des gènes mutateurs et du phénotype associé a permis de comprendre le rôle de plusieurs systèmes cruciaux pour la vie cellulaire tels que les systèmes de correction pendant la réparation ou la réplication de l'ADN ou les systèmes de recombinaison.

2.2.1. Les systèmes de correction pendant la réplication de l'ADN

Chez *E. coli*, la DNA polymérase III est responsable de la plus grande partie du processus de réplication du chromosome et intervient dans la fidélité de la réplication. La DNA polymérase III est un large dimère asymétrique constitué d'au moins dix sous-unités codées par neuf gènes (Kelman & O'Donnell, 1995). Parmi ces sous-unités, la sous-unité α , codée par le gène *dnaE* ou *polC*, présente l'activité exonucléasique 5' vers 3' nécessaire pour la correction des mésappariements (Welch & McHenry, 1982). Par ailleurs, la sous-unité ϵ , codée par le gène *dnaQ* ou *mutD*, possède d'une part l'activité de relecture et d'autre part l'activité exonucléasique 3' vers 5' (McHenry, 1985).

Des mutations dans le gène *dnaE* (*polC*) peuvent soit augmenter la mutagenèse spontanée, conférant ainsi un phénotype mutateur, soit diminuer le taux de mutation spontanée de la cellule, conférant dans ce cas un phénotype antimutateur (Fijalkowska & Schaaper, 1995; Oller & Schaaper, 1994). En fait, la protéine PolC peut être plus (dans ce cas l'effet est antimutateur) ou moins efficace (dans ce cas l'effet est mutateur) dans la correction des nucléotides sélectionnés. Chaque mutation peut aboutir à une structure protéique spécifique qui définit le rôle de la protéine mutée. Plusieurs souches d'*E. coli*, caractérisées par une mutation dans *dnaE*, présentent une fréquence de mutation de 20 à 30 fois inférieure à celle de la souche sauvage (Oller & Schaaper, 1994; Schaaper, 1993). Un seul allèle mutateur

de *dnaE* a été analysé (*dnaE173*). Le produit de ce dernier, qui diffère de celui de l'allèle sauvage par un seul acide aminé, diminue l'efficacité de relecture de la DNA polymérase III (Maki *et al.*, 1991). En fait, bien que la sous-unité ϵ présente une activité exonucléasique 3' vers 5', son interaction avec la sous-unité α est nécessaire pour une activité optimale de correction des mésappariements lors de la réplication.

Par ailleurs, des mutations dans le gène *mutD*, renommé *dnaQ*, confèrent un taux particulièrement grand de mutation spontanée, allant d'un facteur 10^4 à 10^5 fois plus élevé que celui de la souche sauvage. Ces mutations peuvent être soit des substitutions de bases soit des frameshifts sans spécificité de séquence. Etant donné le grand nombre de mutations générées par ces mutants, le système de correction post-réplivative des mésappariements de type MMR devient rapidement saturé et les mutations sont alors fixées dans le génome (Schaaper & Radman, 1989; Wu *et al.*, 1990).

2.2.2. Les systèmes de correction post-réplivative de l'ADN

2.2.2.1. Le système MMR

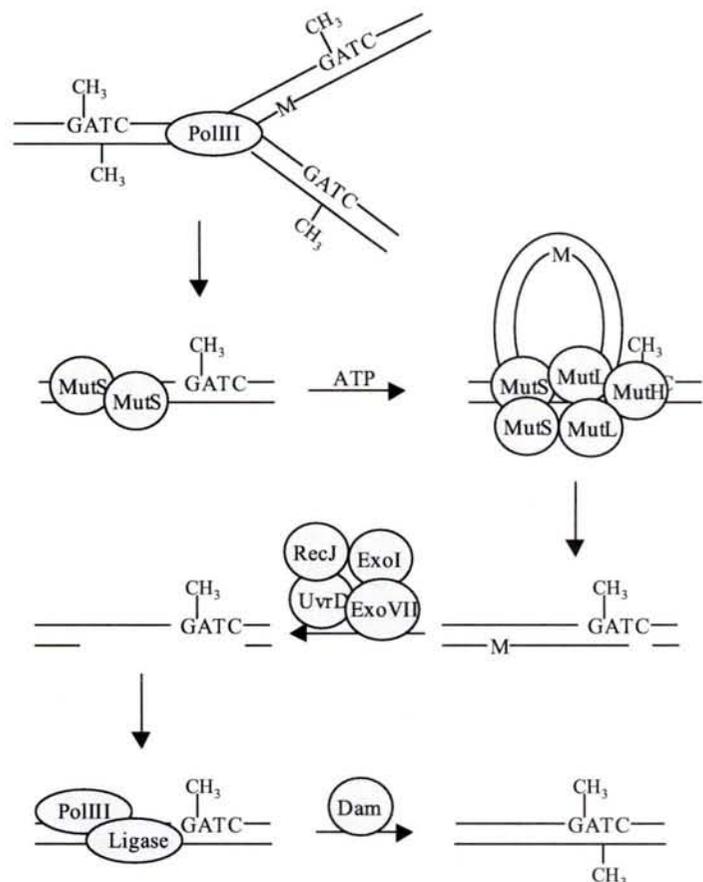
L'élucidation des systèmes de réparation post-réplivative des mésappariements a été possible grâce à la découverte de plusieurs mutateurs affectés dans les gènes impliqués dans l'expression de ce système. Le système MMR (pour Methyl directed Mismatch Repair) est un système de correction des mésappariements dirigé par la méthylation notamment chez *E. coli* et *S. typhimurium* (Hsieh, 2001; LeClerc *et al.*, 1998; Schofield & Hsieh, 2003). Ce système est en fait largement répandu dans le monde bactérien.

Le locus *dam* code une adénine méthylase qui méthyle les résidus A sur chaque brin des séquences GATC (Glickman, 1979). Ainsi, la cellule va pouvoir reconnaître le profil hémiméthylé d'un ADN récemment répliqué (Modrich, 1991). Des mutations dans le locus *dam* confèrent un phénotype mutateur. Dans un contexte *dam*, le brin néosynthétisé ne pourra pas être reconnu et la réparation aura lieu en faveur du brin parental ou du brin néosynthétisé. Par ailleurs, des mutations affectant d'autres gènes du système MMR peuvent également aboutir à un phénotype mutateur, comme les mutations dans *mutH*, *mutL*, *mutS* ou *mutU* (*uvrD*). La figure 1 résume le mode d'action des protéines jouant un rôle dans le système

MMR. Ainsi, des mutations dans *mutS*, qui code une protéine reconnaissant et se fixant sur le mésappariement, ou dans *mutH*, dont le produit est responsable de la reconnaissance de la séquence GATC et ayant une activité endonucléasique permettant l'incision du brin non méthylé, ou dans *mutL*, qui code une protéine interagissant avec MutH et MutS, ou dans *mutU* (*uvrD*), codant une hélicase de type II, conduisent à une augmentation de la mutabilité spontanée (Cox, 1976; Leong *et al.*, 1986; Mechanic *et al.*, 2000; Modrich, 1989; Schaaper & Dunn, 1987; Yamaguchi *et al.*, 1998).

Figure 1 :

Schéma représentatif du système de correction des mésappariements dirigés par la méthylation (le système MTHLS). La fourche de réplication est associée à la polymérase III. Après réplication, les brins méthylé et non méthylé sont distingués et une erreur de mésappariement est symbolisée par la lettre M. MutS se fixe sur le mésappariement. Une structure en boucle est formée avec MutS, MutH et MutL, réaction ATP dépendante. L'incision est catalysée par MutH sur le brin non méthylé. Un trou est formé par l'activité d'exonucléases et de l'hélicase UvrD. La synthèse est ensuite assurée par la polymérase III et la ligase. La méthylation est réalisée par la protéine Dam (d'après Horst *et al.*, 1999).



Les mutateurs provenant d'une inactivation du système MMR présentent des taux très élevés de transitions GC en AT et AT en GC, de frameshifts au niveau de séquences répétées, mono- ou dinucléotidiques, mais présentent également une capacité accrue à recombiner de l'ADN entre séquences hétérosécifiques avec un pourcentage de divergence de l'ordre de 10 % (Dohet *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1987; Zhao & Winkler, 2000). Alors que le système MMR n'intervient pas sur les réarrangements se produisant entre séquences parfaitement homologues, ce système tend à supprimer les recombinaisons entre séquences quasi homologues ou homéologues. En effet, la formation de grandes duplications par recombinaison chez *E. coli* est augmentée d'un facteur 10 chez des mutants *mutL* ou *mutS* (Petit *et al.*, 1991). Les auteurs suggèrent que les protéines MutL et MutS se fixent au niveau des mésappariements sur l'hétéroduplex en cours de formation ce qui déstructurerait l'intermédiaire de recombinaison (Worth *et al.*, 1994). Par ailleurs, des mutants hyperrecombinogènes, mutés dans le gène *uvrD* (ou *mutU*), ont été isolés chez *E. coli*. La fréquence de délétions entre les séquences répétées est fortement augmentée chez ces mutants (Bierne *et al.*, 1997). Par ailleurs, le système MMR fonctionne comme une barrière aux recombinaisons intersécifiques entre *E. coli* et *S. typhimurium* car des mutations dans ce système ont pour conséquence d'affaiblir cette barrière (Rayssiguier *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 1994; Denamur *et al.*, 2000). De plus, des mutations dans les gènes impliqués dans ce système, notamment dans le gène *uvrD*, conduisent à une fréquence de recombinaison élevée de croisements Hfr/F⁻ (Feinstein & Low, 1986). Ainsi, le système MMR empêcherait l'incorporation de séquences hétérologues et donc le transfert horizontal. Cette hypothèse est corroborée par le fait que des souches pathogènes, ayant acquis des gènes de virulence par transfert horizontal, sont souvent déficientes pour le gène *mutS* (Hacker *et al.*, 1997).

Chez *Streptococcus pneumoniae*, un autre système de réparation de mésappariements générés par des erreurs de réplication existe. Il s'agit du système Hex. Deux gènes, *hexA* et *hexB*, ont été identifiés pour intervenir dans ce système. L'inactivation de l'un de ces deux gènes confère un phénotype mutateur (Prudhomme *et al.*, 1991). Les systèmes Mut d'*E. coli* et Hex seraient apparentés et dériveraient d'un système ancestral commun. Les gènes *hexA* et *hexB* présentent des homologies de séquences respectivement avec les gènes *mutS* et *mutL* (Prudhomme *et al.*, 1991). Ces deux systèmes empêchent les événements de recombinaison homéologue entre deux séquences présentant un pourcentage de divergence compris entre 1 et 10 %. Des mutations dans le système Mut peuvent augmenter la fréquence de recombinaison intergénérique entre *E. coli* et *S. typhimurium* (Rayssiguier *et al.*, 1991). Pour le système

Hex, le phénomène est plus complexe. *S. pneumoniae* est une bactérie transformable naturellement. Après transformation, le système Hex peut être saturé si le pourcentage de divergence des séquences acquises est supérieur à 10, contrairement au système Mut. Dans ce cas, ces séquences transférées peuvent être plus fréquemment intégrées par recombinaison et ce système ne serait donc pas une barrière à la recombinaison interspécifique (Majewski *et al.*, 2000). Par ailleurs, le pathogène *Mycoplasma pneumoniae* est actuellement la seule bactérie caractérisée dépourvue des cinq gènes impliqués dans le système MMR. Cette bactérie présente ainsi un taux de mutabilité global très élevé.

2.2.2.2. Le système d'excision des bases endommagées

Les mutateurs décrits ont également permis de clarifier le rôle d'une variété d'enzymes impliquées dans des systèmes de réparation de bases altérées ou endommagées. Par exemple, l'uracile DNA glycolase, codée par le gène *ung*, élimine les résidus uraciles résultant de la désamination des cytosines et formant alors des mésappariements U/G. Chez *E. coli*, les mutants *ung* sont mutateurs et créent à haute fréquence des transitions GC en AT, d'un facteur 10 à 15 fois plus élevé que chez la souche sauvage (Duncan & Weiss, 1982). Par ailleurs, l'endonucléase de type IV et l'exonucléase de type III, codées respectivement par les gènes *nfo* et *xth*, sont deux nucléases abasiques qui clivent les liaisons phosphodiester aux extrémités 5' des sites abasiques, apuriniques/apyrimidiniques (AP), cytotoxiques pour la cellule. La fréquence de mutations spontanées et plus particulièrement des transversions AT en TA est augmentée de 4 à 6 fois chez le double mutant *nfo xth* par rapport à la souche sauvage alors que les simples mutants ne sont pas mutateurs (Kunz *et al.*, 1994). Le produit du gène *vsr*, une endonucléase, supprime les résidus T mésappariés avec les résidus G, phénomène dû à la désamination de la 5-méthylcytosine en thymine. Le phénotype mutateur conféré par une mutation dans ce gène correspond à une augmentation des transitions GC en AT (Macintyre *et al.*, 1997). Enfin, deux gènes mutateurs nommés *ogt* et *ada* codent des méthyltransférases qui suppriment les groupements méthyls au niveau des bases altérées O⁶-méthylguanine, prévenant ainsi les transitions GC en AT (Mackay *et al.*, 1994; Samson, 1992).

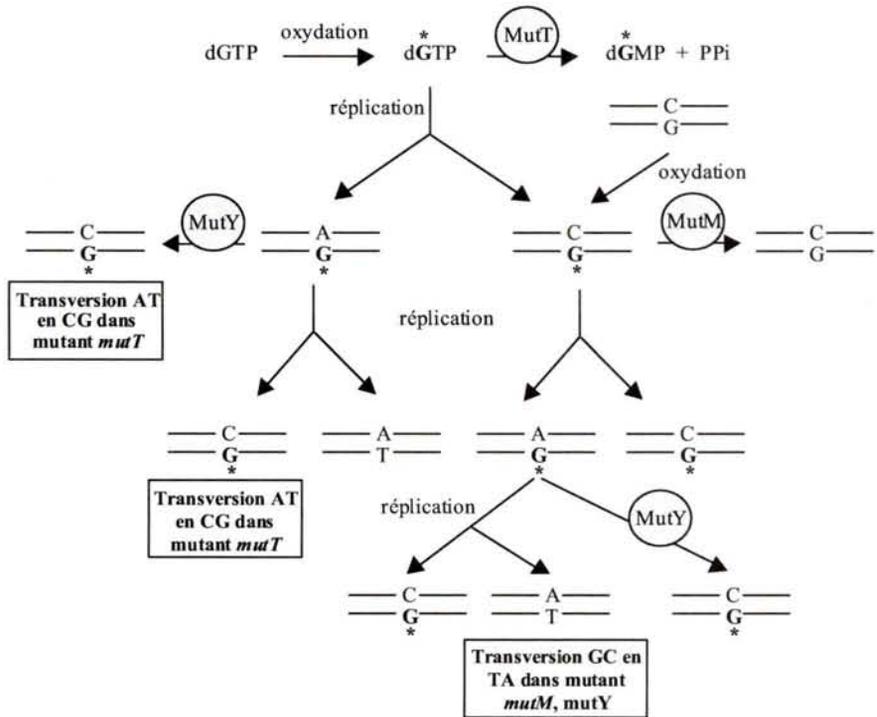
2.2.2.3. Le système de réparation oxydative

Un stress oxydant peut être généré par des agents externes tels que les radiations ionisantes, les oxydants, les peroxydes, mais aussi par le métabolisme normal de la cellule. Ce stress est connu pour induire des dommages à l'ADN en formant des résidus de 8-oxoG. Cette modification provoque, dans la majorité des cas, des transversions GC en TA en incorporant un résidu A en face d'un résidu 8-oxoG pendant la réplication. Plusieurs protéines participent à la réparation de ce type de dommage et la modification de ces protéines conduisent à un phénotype mutateur.

Un des systèmes permettant la réparation des bases oxydantes est un système à deux composants identifié grâce à la caractérisation de mutateurs. En effet, deux loci mutateurs, *mutY* et *mutM*, augmentent spécifiquement les transversions GC en TA (figure 2). La première étape de la réparation fait intervenir une adénine DNA glycolase codée par *mutY* qui clive les résidus A mésappariés avec les résidus 8-oxoG et permet ainsi au système de réparation de remplacer l'adénine par une cytosine (Au *et al.*, 1989; Michaels *et al.*, 1992; Nghiem *et al.*, 1988). Ensuite, la paire 8-oxoG/C régénérée peut être corrigée par la formamidopyrimidine DNA glycolase, codée par *mutM*, protéine capable de supprimer les résidus 8-oxoG de l'ADN (figure 2) (Fowler *et al.*, 2003; Michaels *et al.*, 1991). L'inactivation de l'une des deux protéines conduit à un effet mutateur modéré puisque l'activité de l'une des deux glycolases reste fonctionnelle. En revanche, l'inactivation simultanée de MutY et MutM aboutit à une augmentation importante du taux de mutation global par la génération de transversions GC en TA (Michaels *et al.*, 1992). Il est à noter que MutY empêche également la formation de transversions GC en CG en éliminant les résidus G des mésappariements 8-oxoG/G chez *E. coli* (Zhang *et al.*, 1998).

Figure 2 :

Modèle d'action des protéines MutT, MutM et MutY. Les G* en caractères gras représentent les 8-oxoG. Ce résidu peut être incorporé au niveau d'un résidu A ou C pendant la réplication. Les appariements G*/C peuvent être formés par oxydation et non lors de la réplication (d'après Horst *et al.*, 1999).



Par ailleurs, il a été montré que les mécanismes de recombinaison pouvaient être affectés par le stress oxydant. En effet, chez les bactéries, le peroxyde d'hydrogène ou d'autres oxydants peuvent générer ou stimuler des recombinaisons non homologues (Ouchane *et al.*, 1997). Il a été montré que la fréquence de recombinaison non homologue dépendante d'une courte homologie est augmentée par le peroxyde d'hydrogène et que la protéine MutM est impliquée dans la diminution de cette fréquence (Onda *et al.*, 1999). Lorsque le gène *mutM* est muté, la fréquence d'événements de recombinaison non homologue est augmentée de 5 à 12 fois.

D'autres mécanismes permettant la suppression des résidus 8-oxoG induits par la mutagenèse ont été décrits. Le gène *mutT* code une nucléoside triphosphatase jouant un rôle important dans la réparation des bases oxydées. Ce gène a été le premier gène mutateur décrit chez les bactéries (Yanofsky *et al.*, 1966). Les bases 8-oxoGTP sont hydrolysées par MutT en 8-oxodGMP et PPi empêchant ainsi son incorporation dans l'ADN (figure 2). Ainsi, une mutation dans *mutT* provoque une augmentation drastique des transversions AT en CG d'un facteur 100 à 10000 par rapport à la souche sauvage (Maki & Sekiguchi, 1992). Les gènes *sodA* et *sodB* codent des superoxydes dismutases (SOD) qui convertissent les radicaux

superoxydes, toxiques pour la cellule, en peroxyde d'hydrogène éliminé par la suite par la catalase. En aérobic, les doubles mutants *sodA sodB* présentent un taux de mutation global fortement augmenté (Farr *et al.*, 1986). Par ailleurs, le locus *oxyR* contrôle la régulation de *sodA* et *sodB*. La délétion de ce locus entraîne un phénotype mutateur avec un taux de mutabilité augmenté de 10 à 55 fois chez *S. typhimurium* (Storz *et al.*, 1987). Enfin, les pyrimidines oxydées, comme la 5-hydroxycytosine, sont éliminées par deux activités d'endonucléase de type III et de type VIII codées respectivement par les gènes *nth* et *nei*. Le double mutant présente une activité mutatrice (Jiang *et al.*, 1997).

2.2.3. La recombinaison

L'effet de la mutation de certains gènes mutateurs peut provoquer des événements de réarrangements génomiques tels que des délétions ou inversions de séquences *via* les processus de recombinaison.

Des mutations dans les gènes *hns* (*bglyI*) ou *topB* (*mutR*), codant respectivement une protéine de liaison à l'ADN de type histone-like et une topoisomérase de type III, augmentent la fréquence de délétions spontanées jusqu'à 100 fois (Lejeune & Danchin, 1990; Schofield *et al.*, 1992; Whoriskey *et al.*, 1991). L'absence de ces produits pourrait déstabiliser la structure du chromosome et permettre l'appariement de petites répétitions localisées à des sites distants. Dans ce cas, le phénotype mutateur est qualifié de phénotype hyper-recombinogène.

D'autres gènes impliqués dans les voies de recombinaison sont qualifiés de mutateurs lorsqu'ils sont mutés. Il s'agit par exemple de *recG*, gène codant une hélicase présentant une activité de dissociation des jonctions formées lors de la migration de la croix de Holliday. Un mutant *recG* présente une déficience dans le système de réparation de l'ADN et des mutations de type frameshift se produisent ainsi à haute fréquence (Harris *et al.*, 1996). Le gène *sbcB* est considéré comme un gène mutateur. Ce gène code une exonucléase de type I qui présente une activité exonucléasique 3' vers 5' sur de l'ADN simple brin et intervient pendant les événements de recombinaison non homologue et de recombinaison homologue dans un contexte *recBC*. Le type de mutation créée à haute fréquence par une souche mutante *sbcB* est la délétion de séquences par recombinaison non homologue (Allgood & Silhavy, 1991). Par ailleurs, la protéine SbcC clive les structures secondaires au niveau des fourches de réplication. Lorsque le gène *sbcC* est muté, un état mutateur se met en place, caractérisé par la

production à haute fréquence d'événements d'inversion de courtes séquences homologues (Slupska *et al.*, 2000).

2.2.4. La transcription

La transcription peut favoriser d'une part les mutations ponctuelles et d'autre part les événements de recombinaison. En effet, en induisant la formation d'ADN simple brin lors de la transcription, des sites abasiques peuvent se former par des réactions d'hydrolyse et au niveau desquels la polymérase fait ensuite des erreurs d'incorporation (Wright, 1997). La désamination des résidus cytosine est environ 100 fois plus fréquente sur de l'ADN simple brin que sur de l'ADN double brin. Chez *E. coli*, l'analyse de mutants déficients dans les systèmes de réparation des cytosines désaminés a montré que 77 % des transitions GC en AT produites avaient pour origine le brin non transcrit (Wright, 2000). Par ailleurs, chez *E. coli*, la transcription peut également interagir avec le phénomène de recombinaison homologue en diminuant la longueur d'homologies nécessaires pour l'appariement de deux séquences pour former l'hétéroduplex (Kotani *et al.*, 1996). Alors qu'entre 30 et 150 pb d'homologies sont nécessaires à la formation d'un hétéroduplex suffisamment stable pour que la recombinaison homologue soit initiée, des séquences d'ADN partageant 15 bases d'homologies peuvent former un hétéroduplex si l'une des molécules est transcriptionnellement activée. De plus, l'ARN participerait à la formation d'une structure triple brin dont la stabilité serait accrue. Ainsi, en augmentant la durée de $\frac{1}{2}$ vie de l'hétéroduplex, la probabilité que l'événement de recombinaison se produise augmente (Kotani *et al.*, 1996).

Ainsi, une augmentation du taux de transcription peut conférer à la bactérie un phénotype hyper-recombinogène. Cette augmentation peut être transitoire. Dans ce cas, il s'agit plus particulièrement d'un exemple d'état mutateur transitoire, notion décrite dans le paragraphe suivant. L'augmentation de transcription peut toutefois être acquise si, par exemple, un régulateur d'un promoteur est la cible d'un état mutateur acquis et augmente indirectement la transcription du gène exprimé par ce promoteur. Ainsi, l'augmentation du taux de transcription ou une déficience dans les systèmes de réparation des cytosines désaminées peut conférer à la bactérie un phénotype mutateur.

2.2.5. La traduction

Certains mutateurs ont été décrits comme intervenant dans la modification des ARNt et empêcheraient ainsi l'expression correcte de certaines protéines. Deux gènes mutateurs, *mutA* et *mutC*, codent des ARNt glycine capables lorsqu'ils sont mutés d'incorporer un résidu glycine en lisant un codon aspartate (Slupska *et al.*, 1996). Dans un contexte *mut*, une glycine est incorporée à la place d'un aspartate créant ainsi un pool de protéines modifiées. La sous-unité ϵ de la polymérase III, qui est impliquée dans la relecture de l'ADN au cours de la réplication, contient 16 résidus aspartate dans sa séquence protéique. Ainsi, l'effet mutateur observé dans les souches mutantes *mutA* et *mutC* serait en fait dû à la génération de sous-unités ϵ altérées par incorporation de 16 résidus glycine à la place des 16 résidus aspartate. Par conséquent, les mutants *mutA* et *mutC* produisent le même spectre général de mutations qu'un mutant *mutD* (Michaels *et al.*, 1990).

2.2.6. Conclusion

La majorité des mécanismes décrits dans ce paragraphe ont été caractérisés grâce à l'isolement de souches mutatrices chez *E. coli* ou *S. typhimurium*. Cependant, il est à noter que des homologues aux gènes mutateurs décrits ici sont retrouvés chez d'autres bactéries dont le génome a été totalement séquencé et sont représentés dans le tableau 1. L'analyse a été réalisée sur 26 génomes bactériens et la présence d'un gène homologue à différents gènes mutateurs décrits chez *E. coli* a été recherchée et indiquée dans ce tableau. Les systèmes de correction des mésappariements qui permettent l'intégrité du génome bactérien sont répandus dans le monde bactérien. *M. pneumoniae* est la bactérie qui présente le moins de gènes mutateurs. Par ailleurs, il s'agit de la bactérie, parmi les 26 analysées, qui présente le plus petit génome (0,8 Mb). Cette bactérie vivant dans un environnement intracellulaire et plutôt stable présente peu de systèmes de correction et un petit génome, résultats d'une sélection adaptative. Le gène *mutA* qui code une ARNt glycine est un gène peu répandu dans le monde bactérien. Par contre, le gène *recG* codant une hélicase intervenant lors de la recombinaison serait un gène important dans le monde bactérien car un homologue à ce gène est retrouvé dans 25 génomes sur 26 (sauf *M. pneumoniae*).

	<i>dam</i>	<i>mutH</i>	<i>mutL</i>	<i>mutS</i>	<i>mutU</i> <i>uvrD</i>	<i>mutY</i>	<i>mutM</i>	<i>mutT</i>	<i>sod</i>	<i>nth</i>	<i>nei</i>	<i>ung</i>	<i>nfo</i>	<i>xth</i>	<i>ogt</i>	<i>ada</i>	<i>hns</i> <i>bgly</i>	<i>topB</i> <i>mutR</i>	<i>recG</i>	<i>sbcB</i>	<i>sbcC</i>	<i>mutA</i>
Actinobactéries																						
<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Cyanobactéries																						
<i>Synechocystis</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Firmicutes																						
<i>Bacillus anthracis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Mollicutes																						
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Protéobactéries																						
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Yersinia pestis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Tableau 1 :

Récapitulatif de la présence (+) ou de l'absence (-) des gènes homologues aux gènes mutateurs décrits chez *E. coli* chez des bactéries dont le génome a été totalement séquencé. Cette synthèse a été réalisée après recherche sur le site PubMed des homologues aux gènes décrits chez *E. coli*. Le gène *dam* codant une adénine méthylase et les gènes *mutH*, *mutL*, *mutS* et *mutU* (ou *uvrD*) appartiennent au système MMR. Les gènes *mutY* et *mutM* codent respectivement une adénine et une formamidopyrimidine DNA glycolases. Le gène *mutT* code une nucléoside triphosphatase. *sod* code une superoxyde dismutase. Les gènes *nth*, *nei*, *nfo* et *xth* codent des endonucléases, *ung*, une uracile DNA glycolase, et *ogt* et *ada*, deux méthyltransférases. Les gènes *hns* (ou *bgly*) et *topB* (ou *mutR*) codent respectivement une protéine de liaison à l'ADN et une topoisomérase. Les gènes *recG*, *sbcB* et *sbcC* interviennent dans les systèmes de recombinaison et codent respectivement une hélicase et deux exonucléases.

2.3. Etat mutateur transitoire

En plus de ces systèmes décrits d'hypermutabilité héritable, les bactéries sont également capables de développer un état mutateur transitoire induit dans des conditions de stress. Ainsi, il apparaît que les bactéries en phase stationnaire de croissance ou lors de stress métaboliques ou environnementaux expriment un état hypermutable transitoire dans lequel le taux de mutation va temporairement augmenter.

2.3.1. Induction d'un état mutateur transitoire par le système SOS

En réponse à des stimuli environnementaux ou physiologiques, la cellule peut réduire de façon transitoire la fidélité de la réplication. Ainsi, elle peut entrer dans une phase d'hypermutabilité transitoire. Le système SOS est un système inductible lorsque les cellules sont exposées à des agents endommageant l'ADN tels que les radiations par les UV, les agents alkylants ou d'autres facteurs environnementaux (Caillet-Fauquet *et al.*, 1984; Witkin, 1976). La mutagenèse SOS est médiée par l'induction d'au moins 30 gènes appartenant au régulon transcriptionnellement activé par la fixation de la protéine RecA sous forme activée (RecA*), elle-même codée par un gène du régulon SOS. Celle-ci déréprime alors le régulon SOS en clivant le répresseur LexA et en activant la protéine UmuD. La protéine UmuC participe également à l'altération de la fidélité de la réplication en formant un complexe avec UmuD, complexe appelé DNA polymérase de type V (UmuD'2C) (figure 3) (Tang *et al.*, 1999).

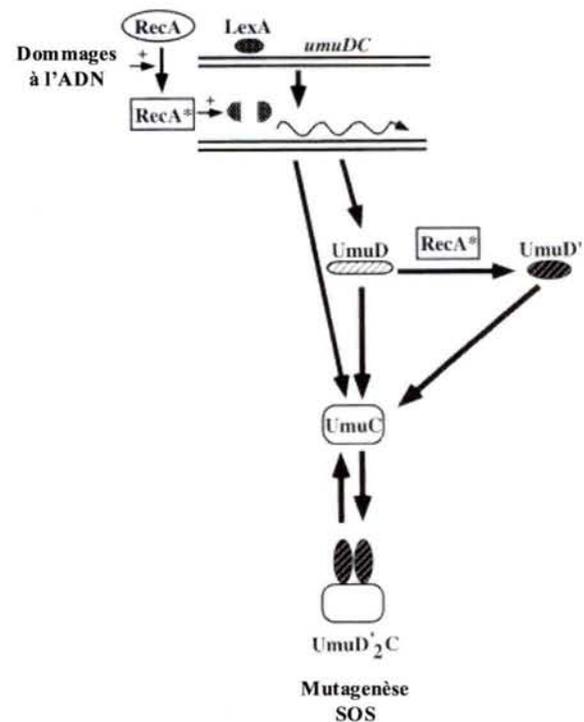


Figure 3 :

Régulation de l'opéron *umuDC* par *RecA* et *LexA* après endommagement de l'ADN. Le signal de l'ADN endommagé convertit *RecA* en *RecA**, la forme activée. *RecA** clive le répresseur *LexA* qui induit la transcription de l'opéron *umuDC* et des autres gènes spécifiques de la réponse SOS. *RecA** est impliquée dans la production de *UmuD'*, qui interagit avec *UmuC* pour former le complexe *UmuD'₂C*. Ce complexe joue un rôle dans la mutagenèse SOS.

Ainsi, chez *E. coli*, la mutagenèse induite dépend principalement de quatre gènes : *recA*, *lexA*, *umuC* et *umuD*. Des mutations dans le gène *recA* et la mutation nulle de *lexA* résultent en une augmentation importante de la fréquence de mutations spontanées (Lauder & Kowalczykowski, 1993; Sweasy *et al.*, 1990). De plus, la surexpression de polymérase « error-prone » telles que le complexe *UmuD'₂C* ou la polymérase de type IV codée par le gène *dinB*, appartenant également au régulon SOS, confère un phénotype mutateur (Rahman & Humayun, 1999; Tang *et al.*, 1999). Ces deux polymérase répliquent l'ADN avec moins de fidélité que celles du complexe de répllication habituel, ce qui explique leur faculté à répliquer des séquences lésées. Le système SOS présente la particularité d'assurer un retour rapide à la normale dans la cellule lorsque le signal inducteur du système est supprimé. Cette réponse étant facilement réversible, le taux de mutations spontanées de la bactérie peut être très modulable et ce de façon transitoire.

2.3.2. Induction d'un état mutateur transitoire en conditions de non croissance

L'analyse du taux de réversion de mutations lac^- vers lac^+ a permis la mise en évidence de phénomènes mutationnels lors de conditions de non croissance, par exemple pendant la phase stationnaire (Foster, 2000). Dans ces conditions, des mutations s'accumulent dans le génome et notamment dans certains gènes dont ceux pouvant conférer un avantage adaptatif immédiat. Le mécanisme mutationnel qui a lieu pendant la phase stationnaire apparaît être différent du mécanisme des mutations produites en pleine phase exponentielle de croissance. En effet, le mécanisme se mettant en place pendant la phase de non croissance nécessite une recombinaison homologue qui forme des cassures double brin impliquées comme intermédiaires de recombinaison. Dans ce cas, le spectre de mutations est restreint et englobe en majorité des délétions d'une paire de base située dans des petites répétitions de mononucléotides (Foster & Rosche, 1999; Harris *et al.*, 1994).

Les mutations en phase stationnaire seraient le résultat d'états hypermutables transitoires dans une partie de la population bactérienne (Rosche & Foster, 1999). Ce type d'état peut être déclenché par une limitation de protéines impliquées dans la réparation des mésappariements (système MMR) comme la protéine MutL (Harris *et al.*, 1999). Harris *et al.* (1997) ont montré que la surexpression de MutL restaure les fonctions de réparation des mésappariements et diminue le taux de mutations générées en condition de non croissance (Harris *et al.*, 1997). Ainsi, il est intéressant de considérer que, chez *E. coli*, l'activité du système de réparation de type MMR n'est pas constitutive mais, au contraire, peut être corrélée à l'état physiologique de la cellule ou à l'état de différenciation de la bactérie.

2.3.3. Induction d'un état mutateur transitoire par la réponse stringente

Une hypermutabilité de la cellule peut être associée à un stress nutritionnel. En effet, le taux de mutations spontanées peut être augmenté lorsque les bactéries sont incapables de croître par manque de nutriments ou par incapacité de les métaboliser (Bridges & Timms, 1997).

Au début d'une carence nutritive, en acides aminés ou en une source énergétique, de nouvelles protéines sont synthétisées qui initient et provoquent des changements dans le métabolisme de la cellule, changements nécessaires à la survie des bactéries pendant cette période de carence. La réponse stringente est une réponse métabolique induite par ce type de changements (Gallant *et al.*, 1972). Cette réponse est caractérisée d'une part par une inhibition de la synthèse des protéines de la machinerie cellulaire telles que les protéines utilisées pour la réplication ou au cours de l'expression génique et d'autre part par une stimulation de la synthèse de certaines protéines telles que des enzymes cataboliques et des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés. Les modulations de la synthèse protéique sont médiées par la guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate (le ppGpp), une alahormone accumulée en réponse au stress (Barker *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 1975). Chez *E. coli* et chez *Streptomyces coelicolor*, la synthèse de ppGpp dépend en partie de la ppGpp synthétase I, produit du gène *relA*, de la ppGpp synthétase II, produit du gène *spoT* et de la concentration cellulaire en ARNt non chargés (Chakraborty & Bibb, 1997; Fiil *et al.*, 1972; Metzger *et al.*, 1989). Chez d'autres espèces bactériennes telles que *Streptococcus equisimilis*, *Corynebacterium glutamicum* ou *B. subtilis*, un seul gène, nommé *relA*, code l'activité ppGpp synthétase requise pour la production de ppGpp (Mechold *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2001; Wehmeier *et al.*, 1998).

Il a été observé que le taux de mutation des gènes induits par le ppGpp lors de la réponse stringente était spécifiquement augmenté (Wright, 1996; Wright *et al.*, 1999). L'estimation du taux de réversion de deux mutations indépendantes conférant une auxotrophie pour la leucine et l'arginine a été établi dans un contexte *relA*⁻ et *relA*⁺. Le taux de réversion semble être plus bas dans un contexte *relA*⁻, lorsque la réponse stringente n'est pas déclenchée, que dans un contexte *relA*⁺ (Wright, 1996). En fait, le ppGpp, produit par la ppGpp synthétase RelA, stimule la transcription de gènes spécifiques. D'une façon générale, une hausse de la transcription de gènes augmente la concentration d'ADN simple brin, connu pour être plus vulnérable face aux phénomènes d'hydrolyse au niveau de sites abasiques (Wright, 1997). Ainsi, la fréquence de mutations est augmentée pendant la transcription des gènes impliqués dans la réponse stringente (Herman & Dworkin, 1971). La réponse stringente est donc aussi un état mutateur qualifié de transitoire permettant à la cellule de générer des mutations à haute fréquence pendant une période non propice à la vie de la bactérie.

2.4. Etat mutateur et impact évolutif

La mise en place d'un état mutateur généralisé qui correspond à l'augmentation de la fréquence de mutations dans l'ensemble des gènes présente un certain coût pour la population. Il est estimé que pour une mutation dite favorable, 10000 mutations non favorables ou délétères ont été produites. Les travaux menés ces dernières années tant sur des souches de laboratoire que sur des isolats de bactéries pathogènes ou commensales, directement prélevés sur des patients, ont montré l'existence d'états mutateurs au sein des populations et le rôle important joué par ces états mutateurs dans l'adaptation des bactéries à de nouveaux milieux.

Ainsi, le taux de mutation est plus élevé pour les populations soumises à des changements environnementaux rapides que pour des populations vivant dans un environnement plus stable. Mao *et al.* (1997) ont montré que plusieurs fortes pressions de sélection successives conduisent une population d'*E. coli* à devenir très majoritairement mutatrice (Mao *et al.*, 1997). Une population bactérienne traitée à la 2-amino-purine, c'est-à-dire en conditions fortement mutagènes, a été successivement cultivée sur milieu permettant de sélectionner la résistance à la rifampicine, à l'acide nalidixique et la réversion Lac⁻ vers Lac⁺. Toutes les colonies survivantes sont mutatrices, présentant une déficience dans le système de réparation MMR et plus particulièrement des mutations dans les gènes *mutH*, *mutL*, *mutS* ou *uvrD*. Un phénotype mutateur peut également être lié à la pathogénicité puisque des changements environnementaux peuvent provoquer des pressions de sélection, comme, par exemple, celles exercées par le contrôle immunitaire de l'hôte ou par un traitement antibiotique. Jyssum *et al.* (1960) ont trouvé que 4 des 110 isolats d'*E. coli* de patients étaient mutateurs (Jyssum, 1960). Sur 408 souches d'*E. coli*, dont 292 isolées de personnes malades et 116 de personnes saines, il a été identifié 1 mutateur parmi les souches pathogènes (Gross & Siegel, 1981). D'autres études ont été réalisées à partir de 349 souches, incluant 268 pathogènes et 81 non pathogènes, appartenant à la collection FDA de pathogènes et une collection de référence d'*E. coli* et *S. enterica* (LeClerc *et al.*, 1996). Les auteurs ont détecté 9 souches mutatrices, indépendantes, toutes pathogènes et toutes déficientes dans le système MMR dont 7 avec des mutations dans le gène *mutS*. Par ailleurs, chez *Pseudomonas aeruginosa*, 25 des 128 souches analysées issues des poumons de 30 malades atteints de mucoviscidose se sont avérées être des mutateurs alors qu'aucune des 75 souches provenant de personnes non atteintes de cette maladie n'était dans un état mutateur détectable (Oliver *et*

al., 2000). Ainsi, chez les bactéries pathogènes, la fréquence de mutateurs est très élevée et est de l'ordre de quelques pour-cent. Ces observations suggèrent que les souches mutatrices pourraient avoir un avantage adaptatif. La présence de mutateurs à des fréquences élevées n'est pas un phénomène limité aux bactéries pathogènes. En effet, lorsque la bactérie *E. coli* B est cultivée sur milieu limitant en glucose pendant un très grand nombre de générations, les mutateurs sont observés à des fréquences supérieures à 10^{-5} (Sniegowski *et al.*, 1997).

Les bactéries se différencient et peuvent exécuter un programme développemental de mort cellulaire déclenché par la phase stationnaire et les carences nutritives, périodes pendant lesquelles ces bactéries produisent à haute fréquence des mutants qui peuvent apporter un avantage dans des conditions de vie limitantes. Les mutations en phase stationnaire, décrites précédemment, générées par une déficience ou une limitation du système MMR, peuvent faire partie de ce programme, permettant de produire de tels mutants à haute fréquence. Contrairement aux hypothèses formulées par Cairns définissant les mutations en phase stationnaire comme étant des mutations dirigées, il a été clairement défini que ces mutations ont lieu de façon aléatoire dans le génome suivant un modèle darwinisme (Cairns *et al.*, 1988; Ninio, 1991; Torkelson *et al.*, 1997). Ainsi, la limitation du système MMR pendant la phase stationnaire correspond à un mécanisme permettant des changements génétiques pouvant être sélectionnés si nécessaire.

En outre, des expériences réalisées sur la souris ont montré que les mutateurs pouvaient être sélectionnés dans certaines conditions environnementales (Giraud *et al.*, 2001; Radman *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 1997). En effet, des mutations dans le gène *mutS* chez les souches mutatrices peuvent favoriser l'adaptation à de nouveaux environnements. Par exemple, lors de la colonisation de l'intestin de souriceaux nouveaux-nés, les souches *mutS* présentent un très fort taux de mutation conférant à la bactérie un avantage adaptatif en lui permettant de s'adapter rapidement à son nouvel environnement.

3. Mécanisme de survie : les loci mutables

3.1. Concept de loci mutables et gènes de contingence

Certaines régions du génome peuvent présenter de forts taux de mutation du fait de l'existence de séquences particulières susceptibles de muter plus fréquemment. Ces loci, qualifiés de mutables, sont souvent associés à des gènes et ces gènes sont alors qualifiés de gènes mutables. La présence de telles séquences pourrait être très avantageuse car elles permettraient une variabilité rapide de certains gènes. Par ailleurs, les gènes de contingence, qualifiés de gènes dispensables car ils ne sont pas absolument nécessaires à la vie cellulaire, peuvent être des gènes mutables (Moxon *et al.*, 1994).

De tels loci ont été d'abord décrits chez les bactéries pathogènes et sont plus particulièrement associés aux gènes impliqués dans la virulence. Les gènes affectés codent entre autres des lipopolysaccharides (LPS), des toxines, des fibrilles, des éléments de capsule. La forte mutabilité de ces loci contrôle l'expression d'une variété d'antigènes de surface et/ou le changement de l'état de phase de la bactérie, c'est-à-dire le passage d'un état ON (expression d'une protéine) à un état OFF (non expression de la protéine) et/ou inversement (Henderson *et al.*, 1999). Ainsi, les loci mutables, qui permettent de façon réversible l'hypervariabilité de certains gènes, conduisent la bactérie à changer rapidement de sérotypes lui permettant d'éviter le système immunitaire de l'hôte ou de phases phénotypiques nécessaires pour infecter une grande variété de tissus.

Des loci mutables ont également été identifiés chez d'autres bactéries et notamment chez *Streptomyces*. Chez cette bactérie, une région qualifiée d'instable pouvant atteindre un quart du génome a été mise en évidence. Cette région peut être délétée sans que la viabilité des mutants ne soit affectée (Leblond *et al.*, 1991; Redenbach *et al.*, 1993). Par ailleurs, il est supposé que cette région hautement mutable contient la plupart des gènes de contingence. Chez *S. coelicolor* dont le génome a été totalement séquencé, tous les gènes de contingence, qui codent entre autres des métabolites secondaires et des enzymes hydrolytiques, sont situés au niveau des deux bras chromosomiques correspondant aux régions de 1,5 Mb du bras chromosomique gauche et de 2,3 Mb du bras chromosomique droit (Bentley *et al.*, 2002). Ce n'est qu'exceptionnellement que les gènes du métabolisme primaire se situent dans la région

variable, comme par exemple le gène *argG* codant une arginosuccinate synthétase chez *Streptomyces lividans* (Ogawara *et al.*, 1993; Redenbach *et al.*, 1993).

En général, les réarrangements d'ADN provoqués par la présence de ces loci mutables sont dits génétiquement programmés et sont médiés par un panel de mécanismes moléculaires qui incluent la recombinaison homologue, la recombinaison site-spécifique, les glissements de brin pendant la réplication ou la réparation de l'ADN, l'activité transposase codée par les éléments IS, le transfert horizontal et la modification de la conformation de l'ADN.

3.2. Mécanismes impliqués dans la mutabilité de gènes de contingence

Les mécanismes mis en jeu dans la mutabilité de certains gènes de contingence sont des mécanismes mutationnels classiques, responsables des mutations spontanées géniques ou chromosomiques. Cependant, ces mécanismes ont lieu à des fréquences beaucoup plus élevées au niveau des loci mutables.

3.2.1. La transposition spécialisée

Les éléments transposables, dont les éléments IS, représentent une source de variabilité non négligeable. L'insertion et l'excision de tels éléments font partie d'un processus mutagénique important chez les bactéries. Leur transposition peut générer d'une part une diversification allélique et d'autre part une modulation de l'expression soit du gène dans lequel l'élément s'est inséré soit du (ou des) gène(s) adjacent(s). Certains éléments transposables, tels que IS30 d'*E. coli* ou Tn4351 de *Bacteroides fragilis*, s'intègrent au niveau de sites spécifiques (Lynn *et al.*, 1995; Olsasz *et al.*, 1998). Ainsi, ces sites spécifiques peuvent être qualifiés de loci mutables. Par ailleurs, bien que la plupart des éléments transposables se transposent à relative basse fréquence (entre 10^{-6} et 10^{-8}), certains au contraire se transposent à plus haute fréquence (entre 10^{-3} et 10^{-4}) (Chalmers and Blott, 1999). Les éléments transposables peuvent être considérés comme des éléments mutateurs dans une cellule car ils peuvent créer des délétions à haute fréquence lorsque l'excision est fréquente et imprécise. De plus, lorsque plusieurs copies de l'élément coexistent dans le même génome, des

réarrangements génomiques peuvent être provoqués par des événements de recombinaison homologue entre ces différentes copies.

Par ailleurs, la transposition peut également contrôler la variation de phase ON \leftrightarrow OFF dans l'expression génique plus particulièrement décrite chez les bactéries pathogènes. Cette situation reste envisageable si l'excision de cet élément est précise. Bien que l'excision précise qui permettrait la réversion vers un phénotype sauvage reste un événement rare ($<10^{-6}$), une telle activité a été impliquée dans le phénomène de variation de phase des polysaccharides extracellulaires chez plusieurs espèces bactériennes et plus particulièrement chez *Pseudomonas atlantica*, *Neisseria meningitidis* et *Staphylococcus epidermis* (Bartlett & Silverman, 1989; Hammerschmidt *et al.*, 1996; Ziebuhr *et al.*, 1999). Par exemple, chez *P. atlantica*, l'élément IS492 de 1,2 kb s'insère et s'excise du gène *eps* et produit ainsi une variation de phase de la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) (Bartlett & Silverman, 1989).

3.2.2. Le transfert horizontal

Le transfert horizontal peut être défini comme l'acquisition d'un fragment d'ADN étranger par conjugaison, transformation ou transduction et son maintien 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 dit mosaïque augmente la valeur adaptative de la bactérie, il sera maintenu dans le génome.

Ainsi, il a été mis en évidence chez *H. pylori* une structure chimérique au niveau d'une région hypervariable correspondant à un îlot de pathogénicité. La comparaison des séquences de cette région dans deux souches d'*H. pylori* a révélé la coexistence de séquences identiques et de séquences très différentes. Ces dernières représentent 6 à 7 % des gènes présents dans chaque souche. La moitié des séquences souches-spécifiques appartiennent à cette région hypervariable associée principalement aux fonctions de systèmes de restriction-modification. Ainsi, 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 & Trust, 1999). Un autre exemple concerne le locus CPS codant les

exopolysaccharides nécessaires à la formation de la capsule chez *S. pneumoniae*. Ce locus présente également une structure de type chimérique issue de recombinaisons homéologues entre fragments d'ADN provenant de différentes souches (Morona *et al.*, 1999). Cette grande diversité d'exopolysaccharides produits permet à ces bactéries pathogènes d'échapper plus efficacement au système immunitaire de l'hôte.

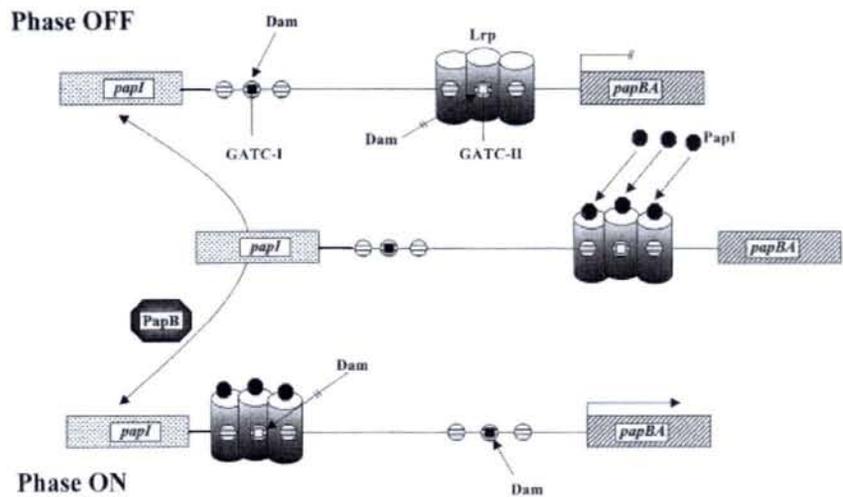
3.2.3. La méthylation et la modification de la conformation de l'ADN

La méthylation site-spécifique et le changement de conformation de l'ADN sont deux mécanismes qui peuvent conduire à une modification réversible de l'ADN et par conséquent peuvent moduler l'expression d'un gène par variation de phase. Ces deux mécanismes font intervenir un type de mutation qualifié d'épimutation. L'épimutation est transmissible à la descendance mais n'altère pas la séquence nucléotidique (Holliday, 1994). Via ces deux mécanismes, l'épimutation peut affecter des sites spécifiques et notamment des gènes qualifiés alors de mutables et peut ainsi moduler l'expression de ces gènes.

La variation de phase peut être médiée par une méthylation différentielle faisant intervenir des régulateurs pouvant altérer à haute fréquence la transcription d'un gène mutable. Un exemple impliquant ce type de régulation a été mis en évidence chez *E. coli*. Chez cette bactérie, la quantité de pili est régulée en réponse aux facteurs environnementaux comme la source de carbone, le pH ou la température (Moxon *et al.*, 1994). La variation de phase de l'opéron *pap* implique une méthylation différentielle de deux séquences GATC (GATC-I et GATC-II) (figure 4) (Braaten *et al.*, 1994). En état ON, c'est-à-dire lorsque le site GATC-I n'est pas méthylé alors que le site GATC-II l'est, le gène *papBA* est transcrit et le pilus peut alors être synthétisé. Le cas contraire se produit dans des cellules en état OFF (Braaten *et al.*, 1994). Pour la variation de phase, c'est-à-dire le passage d'un état ON à un état OFF et/ou inversement, plusieurs facteurs interviennent et notamment la protéine Lrp, qui bloque la méthylation en se fixant sur les séquences GATC et dont la fixation est modulée par la protéine *papI* de l'opéron *pap*, et la protéine Dam, qui méthyle le résidu A de la séquence GATC (Abraham & Beachey, 1987).

Figure 4 :

Variation de phase par méthylation différentielle au niveau de l'opéron *pap* d'*E. coli*. Les 2 sites GATC (I et II) sont méthylés de façon différentielle par action des protéines Lrp et Dam. Le site méthylé est indiqué par un carré noir. L'état inactif OFF et l'état actif ON sont figurés ainsi que les protéines régulatrices PapI et PapB (d'après Henderson *et al.*, 1999).



L'inactivation de l'expression génique par condensation de la chromatine a longtemps été considérée comme un processus spécifique aux eucaryotes. Cependant, ce type de régulation a été mis en évidence chez *E. coli*. Le chromosome bactérien est associé à des protéines de liaison à l'ADN appelées histone-like et incluant les protéines HU et H-NS. Chez *E. coli*, l'opéron *bgl*, impliqué dans l'utilisation des β -glucosides, peut se trouver dans un état de non-expression (silencing), causé par la liaison au niveau du promoteur de l'opéron du facteur σ^S et de la protéine H-NS (Ohta *et al.*, 1999).

3.2.4. La recombinaison

3.2.4.1. La recombinaison homologue

Il s'agit d'un mécanisme central de la cellule notamment impliqué dans les processus de variation de phase ON \leftrightarrow OFF et de la variation antigénique chez les bactéries pathogènes. Chez ces bactéries, la variation de phase 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 de pili de type IV chez *Neisseria gonorrhoeae* dépend de ce mécanisme de régulation (Mehr & Seifert, 1998). Dans ce cas, le gène mutable est le gène *pilE* (E pour « expressed ») qui code 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 suite à des événements de conversion génique. Les allèles résultants, nommés *pilS* (S pour « silent »), codent pour des protéines solubles excrétées hors de la cellule (Haas & Meyer, 1987). Ainsi, le passage d'un état ON (production du pilus) à un état OFF (non production du pilus) ou inversement se produit à haute fréquence. Une autre protéine variante, nommée PilL, qui s'accumule au niveau du périplasme et/ou de la membrane externe, peut être exprimée suite à une recombinaison entre *pilE* et *pilS* (Seifert, 1996). Un mécanisme de conversion génique similaire, où le gène exprimé est remplacé par une copie silencieuse de ce gène présente dans un locus distinct, existe chez *Borrelia hermsii* pour le gène *vmp* qui code une protéine de la membrane externe (Kitten *et al.*, 1993). Tous ces mécanismes de recombinaison homologue sont RecA dépendants.

3.2.4.2. La recombinaison site-spécifique

Un autre type de 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 du gène qualifié de mutable (Henderson *et al.*, 1999). Ce mécanisme est notamment impliqué dans la régulation de synthèse de pili de type I chez *E. coli* et des flagelles chez *S. typhimurium*. La variation de phase ON \leftrightarrow OFF des pili de type I est médiée par l'inversion d'une région de 314 pb localisée en amont du gène *fimA*, codant la sous-unité structurale du pilus (figure 5 I.) (Abraham *et al.*, 1986). En phase ON, le promoteur est en position correcte pour l'initiation de la transcription de ce gène, ce qui n'est pas le cas après inversion (phase OFF). L'inversion de ce fragment est sous le contrôle de différents facteurs tels que les produits des gènes *fimB* et *fimE*, des protéines régulatrices HNS, IHF (Integration Host Factor) et Lrp (Leucine responsive regulatory protein) (Blomfield *et al.*, 1997; Dorman & Higgins, 1987).

Chez *S. typhimurium*, la variation de phase est complexe et contrôle l'expression alternative de deux flagelles, H1 et H2 (figure 5 II.) (Ikeda *et al.*, 2001). La région inversible de 966 pb englobe le promoteur du gène codant le flagelle H2 et le gène répresseur *rhI*. En orientation ON_{H2}/OFF_{H1}, ces deux gènes sont codés et le produit du gène *rhI* réprime la transcription du gène *h1* qui code le flagelle H1. En orientation ON_{H1}/OFF_{H2}, le promoteur en sens inverse ne permettant plus la transcription des gènes *h2* et *rhI*, le gène *h1* est alors

transcrit. Par ailleurs, cette inversion requiert la recombinaise site-spécifique Hin et les protéines Fis et HU (Moxon *et al.*, 1994).

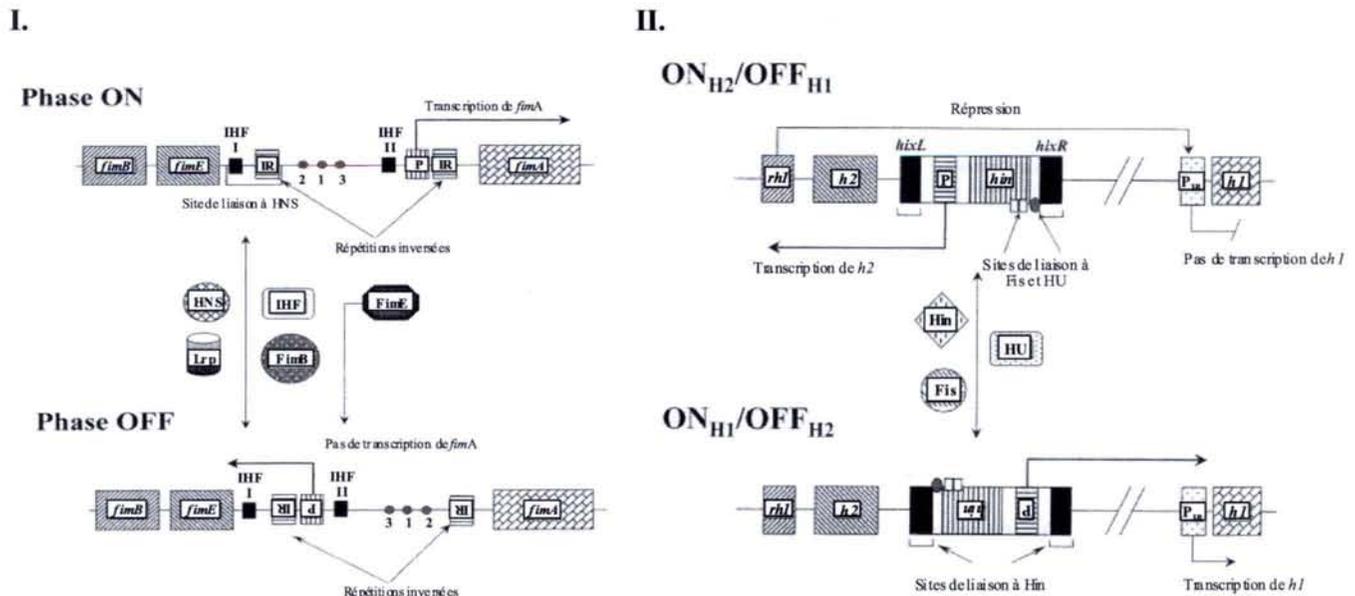


Figure 5 :

I. Mécanisme de variation de phase du gène *fimA* impliqué dans la synthèse de pili chez *E. coli*. La région inversible, 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 HNS, Lrp et IHF (d'après Henderson *et al.*, 1999).

II. Mécanisme de variation de phase des gènes codant les flagelles H1 et H2 de *S. typhimurium*. La région inversible 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 recombinaise site-spécifique *hin* est indiquée ainsi que l'implication des protéines Hin, Fis et HU (d'après Henderson *et al.*, 1999).

Ces événements de recombinaison site-spécifique qui impliquent des inversions de séquences sont réversibles. Cependant, il existe une exception d'événement de recombinaison site-spécifique associé à une délétion chez *B. subtilis* lors de la sporulation. Une étape essentielle pour la lyse de la cellule mère est l'activation du facteur σ^K dans la cellule mère. Ce facteur σ est codé par le gène structural *sigK*, composé de deux gènes tronqués *spoIVCB* et *spoIIIC*. Sur le chromosome de *B. subtilis*, ces deux gènes sont séparés de 42 kb. Au cours de la sporulation, dans la cellule mère uniquement, une cascade d'événements conduit à l'expression de la recombinaise SpoIVCA qui provoque une délétion irréversible de la région

de 42 kb. Ainsi, les deux gènes reliés qui constituent le gène *sigK* codent ce facteur σ requis pour la maturation des spores (Kunkel *et al.*, 1990).

3.2.4.3. La recombinaison non homologue

La recombinaison non homologue peut avoir lieu au niveau de segments d'ADN répétés. Ces régions à répétitions sont des points chauds de mésappariements transitoires lors de la réplication de l'ADN. Ce processus est appelé mésappariement par glissement de brin ou SSM pour Slipped-Strand Mismatching. Le nombre d'unités répétées peut ainsi varier et provoquer des changements au niveau de l'expression génique. La variation de phase, qui résulte de la 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 de ce gène (Henderson *et al.*, 1999).

La modulation de l'expression génique par glissement de brin pendant la transcription est le résultat d'un événement de SSM dans une région généralement localisée en amont du gène cible qualifié alors de mutable. Chez *Neisseria meningitidis*, la protéine de la membrane externe Opc est régulée par un tel mécanisme (figure 6) (Sarkari *et al.*, 1994). La variation de phase est produite par glissement de brin au niveau d'une région riche en résidus C localisée entre les régions -10 et -35 du promoteur de *opc*. Lorsque le nombre de C est de 12 ou 13, la cellule produit la protéine Opc. Si ce nombre est égal à 11 ou 14, les transcrits du gène *opc* sont 10 fois moins abondants. Par ailleurs, quand le nombre de C est supérieur à 15 ou inférieur à 10, aucun transcrit *opc* n'est détecté (Sarkari *et al.*, 1994).

Les gènes *opa* de *N. gonorrhoeae* sont régulés au niveau traductionnel par un mécanisme de variation de phase de type SSM. Plusieurs copies du gène *opa* codant des antigènes de surface sont localisées à différents loci sur le chromosome. Chaque copie porte une répétition CTTCT et en fonction du nombre de répétitions, le gène *opa* est 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 d'être en phase et l'expression de la protéine. En phase OFF, des protéines tronquées ou aberrantes sont produites. Ainsi, il peut exister une grande diversité antigénique de cette protéine dans une cellule. Chez *H. pylori*, 27 gènes présentant des séquences répétées impliquées dans la variation de phase seraient régulés par ce mécanisme

de glissement de brin. Les protéines codées par ces gènes mutables interviennent dans la biosynthèse de lipopolysaccharides, dans le système de restriction-modification ou sont des protéines de surface (Saunders *et al.*, 1998).

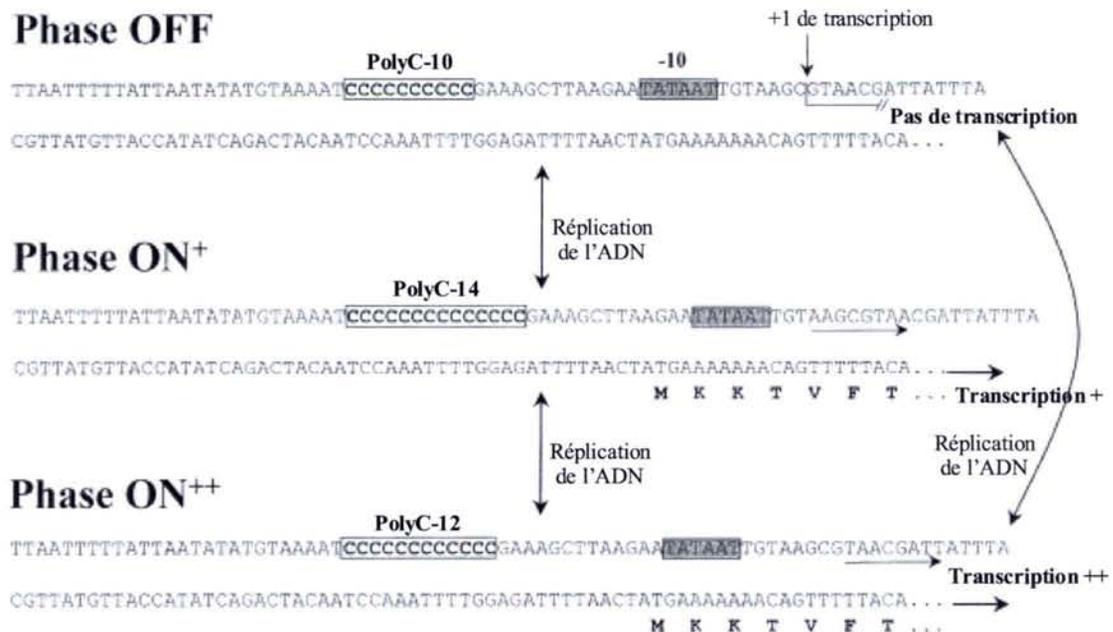


Figure 6 :
Mécanisme de variation de phase par glissement de brin dans une région localisée en amont du gène *opc* chez *N. meningitidis*. La boîte -10 et la répétition polyC sont indiquées. En présence de 10 C, la transcription de *opc* n'a pas lieu (phase OFF). Le gène est transcrit normalement lorsque la région répétée présente 12 C (phase ON⁺⁺). En présence de 14 C, les transcrits de ce gène sont 10 fois moins abondants (phase ON⁺) (d'après Henderson *et al.*, 1999).

De plus, il a été montré qu'il n'existait pas forcément un lien entre la variation de phase d'un gène mutable et l'état mutateur de la cellule. Par exemple, la variation de phase qui affecte la protéine Opc chez *N. gonorrhoeae* n'est pas diminuée dans un mutant *mutS* déficient pour la réparation des mésappariements et cette variation est RecA indépendante (Murphy *et al.*, 1989).

3.3. Les loci mutables et les réarrangements génomiques

Certains loci mutables peuvent être à l'origine de grands réarrangements génomiques provoquant ainsi une destruction du chromosome. L'étude de l'instabilité génétique chez *Streptomyces* a révélé que des événements, produits à haute fréquence, de délétions associées à des amplifications de séquences affectaient plus particulièrement certains gènes. L'amplification consiste en la réitération en tandem d'une séquence appelée AUD pour Amplifiable Unit of DNA (Leblond *et al.*, 1991). Au niveau des AUD caractérisées chez *Streptomyces*, il a été révélé la présence de gènes de nature variée comme des gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds ou des gènes codant des polycétones synthétases (Leblond *et al.*, 1991).

3.4. Les loci mutables et leur impact évolutif

Les réarrangements d'ADN qui ont lieu dans des loci mutables peuvent conduire soit à une variation de phase permettant, ainsi, à l'expression d'une protéine de passer d'un état ON à un état OFF et/ou inversement soit à une altération des propriétés de la protéine produite ce qui correspond à la variation antigénique (Henderson *et al.*, 1999). Il est à noter que la variation de phase est un processus stochastique qui génère une combinaison de phénotypes aléatoires sans aucune anticipation sur l'avantage adaptatif que pourrait procurer un tel phénotype pour la bactérie. Ainsi, face à un environnement changeant, les bactéries dont le génome est sujet à de telles variations sont plus aptes à s'adapter dans leur nouvelle niche écologique.

La fréquence de la variation de phase peut être modulable en fonction des conditions environnementales. En effet, dans certaines conditions, certains phénotypes peuvent être préférentiellement exprimés (Henderson *et al.*, 1999). Par exemple, certains systèmes qui impliquent des inversions de séquences par recombinaison site-spécifique sont contrôlés par des facteurs auxiliaires. L'expression ou l'activité de ces facteurs peut être liée à l'état physiologique de la cellule. Chez *S. typhimurium*, la recombinaison catalysée par une invertase telle que la recombinase Hin requiert la fixation de la protéine de liaison à l'ADN Fis (Merickel *et al.*, 1998). Fis est une protéine exprimée de façon transitoire lorsque les

cellules passent d'un état de non croissance à un état de croissance. Dans ce cas, les inversions de séquences correspondant à une variation de phase ont lieu plus fréquemment lors d'un changement vers une croissance bactérienne plus favorable (Merickel *et al.*, 1998). Un mécanisme de variation de phase par recombinaison site-spécifique se manifeste chez *E. coli* lors de la production de fimbriae (Kulasekara & Blomfield, 1999). Dans ce mécanisme, deux recombinases, FimB et FimE, interviennent. FimB catalyse la recombinaison dans les deux sens (orientation ON vers OFF et inversement) alors que FimE inverse le fragment d'ADN vers la position OFF uniquement et ce de façon plus prédominante (Kulasekara & Blomfield, 1999). Par ailleurs, l'inversion peut également être déclenchée par des paramètres environnementaux tels que la composition du milieu et la température. Par exemple, à 37°C et plus, la fréquence du passage d'un état OFF à ON est fortement augmentée. Les cellules présentant à leur surface des fimbriae sont ainsi plus fréquentes et ce dans les conditions rencontrées lors de l'infection de leur hôte (>37°C) (Gally *et al.*, 1993). La variation de phase provoquée par un mécanisme de conversion génique peut également être régulée par un facteur environnemental. Par exemple, pour le pathogène *Borrelia burgdorferi*, la variation de phase qui affecte l'expression de la protéine VlsE a lieu *in vivo* mais pas *in vitro*. Ces observations suggèrent que la conversion génique, dans cet exemple, serait contrôlée par des signaux spécifiques de l'hôte (Zhang & Norris, 1998).

Dans la majorité des cas, les loci mutables présentent des fonctions associées au pouvoir pathogène. Les bactéries pathogènes ou commensales qui présentent une telle diversité d'antigènes de surface ont ainsi la possibilité d'échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte et de s'adapter à différentes niches écologiques. Bien que tous les exemples cités précédemment pour décrire les mécanismes de variation de phase soient des gènes mutables associés aux fonctions de pathogénicité, d'autres impliqués dans des fonctions différentes ont été décrits dans la littérature. Certains loci mutables codent des systèmes de restriction-modification. Chez *H. pylori*, ces systèmes mutables à haute fréquence ont été probablement acquis par transfert horizontal (Alm *et al.*, 1999). Ils correspondraient à des systèmes immunitaires protégeant ces bactéries des infections par des bactériophages. Certains loci mutables identifiés chez *Neisseria* sont associés aux voies de biosynthèse et cataboliques (Saunders *et al.*, 2000). Les bactéries mettant en jeu ce type de mécanisme de variation de phase auraient l'opportunité de s'adapter plus facilement à certains changements métaboliques.

4. Une stratégie de survie : variation de l'expression génique

La majorité des espèces bactériennes présente la capacité de croître rapidement lorsque les nutriments sont disponibles et lorsque les conditions sont appropriées pour la croissance. En outre, dans des conditions non optimales pour la croissance, ces bactéries présentent la capacité de rester en vie. Une réponse des cellules aux conditions de carence, qui a été développée préalablement, est l'augmentation de leur taux de mutation soit de façon globale par l'établissement d'un état mutateur soit de façon spécialisée par la présence au sein du génome de loci dits de contingence. Les bactéries possèdent d'autres mécanismes qui leur permettent de maintenir une viabilité cellulaire pendant la carence et de reprendre une croissance rapide lorsque les nutriments sont de nouveau disponibles. En réponse aux conditions de carences, certaines espèces forment des spores et d'autres sont capables de former des agrégats multicellulaires. Par ailleurs, sans forcément élaborer une structure différenciée, beaucoup de bactéries entrent dans un programme induit par la carence qui conduit à des changements métaboliques et physiologiques de la cellule. Ces changements se font *via* la variation de l'expression de certains gènes et conduisent à une diminution du métabolisme de la cellule et une augmentation de sa résistance. Différents facteurs permettent de moduler l'expression d'un gène. Un des programmes induit par une carence est la réponse stringente.

4.1. Rôle du ppGpp dans la modulation de l'expression génique

Pendant les carences nutritives, l'accumulation de l'alahormone ppGpp initie un changement global du métabolisme cellulaire, appelé la réponse stringente. Ainsi, l'accumulation de ppGpp peut jouer le rôle de lien entre le stress nutritionnel et l'adaptation des bactéries à ces nouvelles conditions de vie. Le processus qui transduit les signaux environnementaux à l'activation du gène *relA* permettant la synthèse de ppGpp est peu connu. Un des paramètres serait l'accumulation d'ARNt non chargés dans la cellule (Haseltine & Block, 1973). Le ppGpp joue le rôle de régulateur transcriptionnel, négatif ou positif. Par ailleurs, ce nucléotide influencerait également la réplication de l'ADN, la recombinaison et la réparation (Autret *et al.*, 1999; McGlynn & Lloyd, 2000). Par des expériences *in vitro*, une interaction entre le ppGpp et l'ARN polymérase a été mise en évidence. Le site de liaison du

ppGpp serait une interface constituée des sous-unités β , β' et σ . Cette liaison induirait un changement conformationnel de l'enzyme et par conséquent une modification de la sélectivité des promoteurs (Chatterji *et al.*, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001).

La réponse stringente médiée par le ppGpp influencerait une cascade d'événements nécessaires à l'adaptation bactérienne aux carences nutritives, telle que la sporulation, la virulence et la synthèse de métabolites, comme les antibiotiques.

Le rôle du ppGpp dans la sporulation a été bien étudié notamment chez *Myxococcus xanthus*, bactérie formant des myxospores résistantes aux stress lors de carences nutritionnelles. Il a été montré qu'un taux élevé de ppGpp pouvait initier le signal primaire (le signal A) du développement des myxospores. Par ailleurs, un mutant *relA* de *M. xanthus* ne produit pas le signal A et par conséquent n'entre pas dans un tel processus de sporulation (Harris *et al.*, 1998). La réponse stringente serait également impliquée dans les propriétés de virulence des bactéries pathogènes. En effet, Hammer et Swanson ont montré qu'un niveau élevé de ppGpp induisait des propriétés de virulence chez le pathogène *Legionella pneumophila* (Hammer & Swanson, 1999). Lorsque cette bactérie est exposée à un stress nutritif, la réponse stringente induite aboutit à une modification de l'expression des antigènes de surface et à l'exploitation éventuelle d'une nouvelle niche pour la bactérie, conférant ainsi un moyen de survie contre la réponse immunitaire de l'hôte. Le rôle de la réponse stringente dans la pathogénicité a également été mis en évidence chez *Mycobacterium tuberculosis*, pathogène pouvant perdurer dans un état de latence dans l'hôte. Le mutant *relA* de *M. tuberculosis* perd sa capacité à survivre sous carences prolongées et en anaérobiose, des conditions retrouvées chez l'hôte (Primm *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent que les voies de régulation dépendantes de RelA sont nécessaires aux mycobactéries pour passer d'un état répliatif à un état latent et inversement. Dans leur habitat naturel, certaines bactéries vont synthétiser des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires qui pourraient leur apporter un avantage sélectif par rapport à d'autres espèces bactériennes. La production de tels métabolites peut être induite par un stress nutritionnel. Ainsi, la synthèse d'antibiotiques chez *Streptomyces antibioticus* et *S. coelicolor* est influencée par le niveau intracellulaire de ppGpp. Les mutants *relA* de ces espèces présentent donc une déficience dans la production d'antibiotiques (Hoyt & Jones, 1999; Kang *et al.*, 1998). Par ailleurs, *E. coli* produit de la colicine K en réponse à une limitation en nutriments et la synthèse de ce métabolite est activée au niveau transcriptionnel par le ppGpp (Kuhar & Zgur-Bertok, 1999).

4.2. Rôle des facteurs sigma dans la modulation de l'expression génique

L'initiation de la transcription est catalysée par l'ARN polymérase. Le noyau de cette enzyme est constitué de 5 sous-unités ; αI , αII , β , β' et ω , et la structure et la fonction de chacune de ces sous-unités sont très conservées chez les bactéries (Darst, 2001). Pour former l'holoenzyme, l'ARN polymérase doit être associée à un facteur transcriptionnel, un polypeptide nommé facteur sigma (σ). Différents facteurs σ permettent d'initier la transcription de gènes spécifiques par la reconnaissance de séquences consensus correspondant aux boîtes -10 et -35 situées en amont de ces gènes. Cette variété de facteurs σ permet à la bactérie de maintenir aussi bien une expression génique basale qu'une régulation de l'expression génique en réponse à des stimuli environnementaux spécifiques. Les facteurs σ peuvent être régulés à différents niveaux et notamment par des mécanismes d'interaction avec des protéines inhibitrices telles que les facteurs anti-sigma ($\text{anti}\sigma$), eux-mêmes pouvant être régulés, dans quelques cas décrits, par des facteurs anti-anti-sigma ($\text{anti-anti}\sigma$).

4.2.1. Facteurs sigma, anti-sigma, anti-anti-sigma

4.2.1.1. Les facteurs sigma

Les facteurs σ bactériens peuvent être regroupés en deux classes : la classe des σ^{70} et celle des σ^{54} (Wosten, 1998). La majorité des facteurs σ appartient à la famille σ^{70} , divisée, par ailleurs, en sous-groupes suivant leur fonction et leur conservation de domaines. Ainsi, les différentes catégories représentent les facteurs σ primaires, les facteurs σ non essentiels et les facteurs σ alternatifs. Quelques exemples de facteurs sigma appartenant à chacun de ces groupes sont représentés dans le tableau 2. De plus, un réseau phylogénétique a été établi à partir des séquences de facteurs sigma identifiés chez différentes espèces bactériennes et représente les différents sous-groupes de la famille σ^{70} (figure 7).

Groupes	Organismes et noms des σ	Fonctions	Références
1. Familles des facteurs σ^{70}			
<u>1.1. Facteurs σ primaires</u>	Bactéries Gram ⁻ , σ^{70} ; Bactéries Gram ⁺ , σ^A ; <i>Mycobacteria</i> , MysA ; <i>Streptomyces</i> , HrdB	Pendant la phase exponentielle de croissance, ils régulent la transcription des gènes de ménage.	Gruber <i>et al.</i> , 1997 Deora and Misra, 1996
<u>1.2. Facteurs σ non essentiels</u>			
1.2.1. Facteurs σ phase stationnaire	Enterobactéries, <i>Pseudomonas</i> , RpoS	Ils contrôlent l'entrée en phase stationnaire et régulent l'expression génique dans les cellules exposées aux stress osmotique et acide.	Loewen and Hengge-Aronis, 1994
1.2.2. Facteurs σ cyanobactériens	<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Anabaena</i> , SigB-E	Ils contrôlent l'expression génique pendant la réponse circadienne.	Nair <i>et al.</i> , 2002
1.2.3. Facteurs σ bactéries Gram ⁺ à haut GC	<i>Mycobacteria</i> , MysB ; <i>Corynebacteria</i> , SigB ; <i>Streptomyces</i> , HrdA, HrdC-E	Inconnue	Gruber <i>et al.</i> , 1997
<u>1.3. Facteurs σ alternatifs</u>			
1.3.1. Facteurs σ flagellaires	Enterobactéries, σ^{28} ; <i>Streptomyces</i> , WhiG ; <i>Bacillus subtilis</i> , σ^D	Ils contrôlent l'expression des gènes de biosynthèse de flagelles et de la sporulation.	Chater <i>et al.</i> , 1989 Helmann, 1991
1.3.2. Facteurs σ ECF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , AlgU ; <i>Escherichia coli</i> , FecI ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> , PbrA ; <i>Myxococcus xanthus</i> , CarQ ; <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>E. coli</i> , <i>Mycobacteria</i> , σ^E ; <i>Pseudomonas synrigae</i> , HprL ; <i>Alcaligenes eutrophus</i> , CmH ; <i>B. subtilis</i> , SigM, SigV-Z	Ils régulent l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse d'alginate, de caroténoïdes, dans le transport du fer, dans la production d'antibiotiques, dans l'induction des facteurs de virulence, dans la résistance au cobalt, au nickel et aux températures élevées.	De Las Penas and Connolly, 1997 Lonetto <i>et al.</i> , 1994 Missiakas and Raina, 1998 Raivio and Silhavy, 2001 Thackray and Moir, 2003
1.3.3. Facteurs σ « heat shock »	Bactéries Gram ⁻ , σ^{32} ; <i>M. xanthus</i> , SigB ; <i>Streptomyces aurantiaca</i> , SigC ; <i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus</i> , σ^B ; <i>Mycobacteria</i> , <i>Streptomyces</i> , SigF, SigH, SigR	Ils contrôlent l'expression des gènes pendant le stress, la sporulation, la formation du corps de fructification et la maturation des myxospores.	DeMaio <i>et al.</i> , 1996 Hecker <i>et al.</i> , 1996 Paget and Molle, 2001 Yura <i>et al.</i> , 1993 Wu <i>et al.</i> , 1996
1.3.4. Facteurs σ sporulation	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , σ^H , σ^F , σ^E , σ^G , σ^K	Ils régulent la transcription des gènes impliqués dans les différentes étapes du processus de sporulation (dans la cellule mère et dans la préspore).	Haldenwang, 1995 Sauer <i>et al.</i> , 1995
2. Famille des facteurs σ^{54}	Enterobactéries, <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Caulobacter</i>	Ils contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la fixation d'azote, la synthèse de glutamine, le transport de dicarboxylate, la dégradation du xylène, la synthèse de flagelles, la production de levanase.	Merrick, 1993

Tableau 2 :Fonctions et distributions de différents facteurs σ identifiés chez les bactéries.

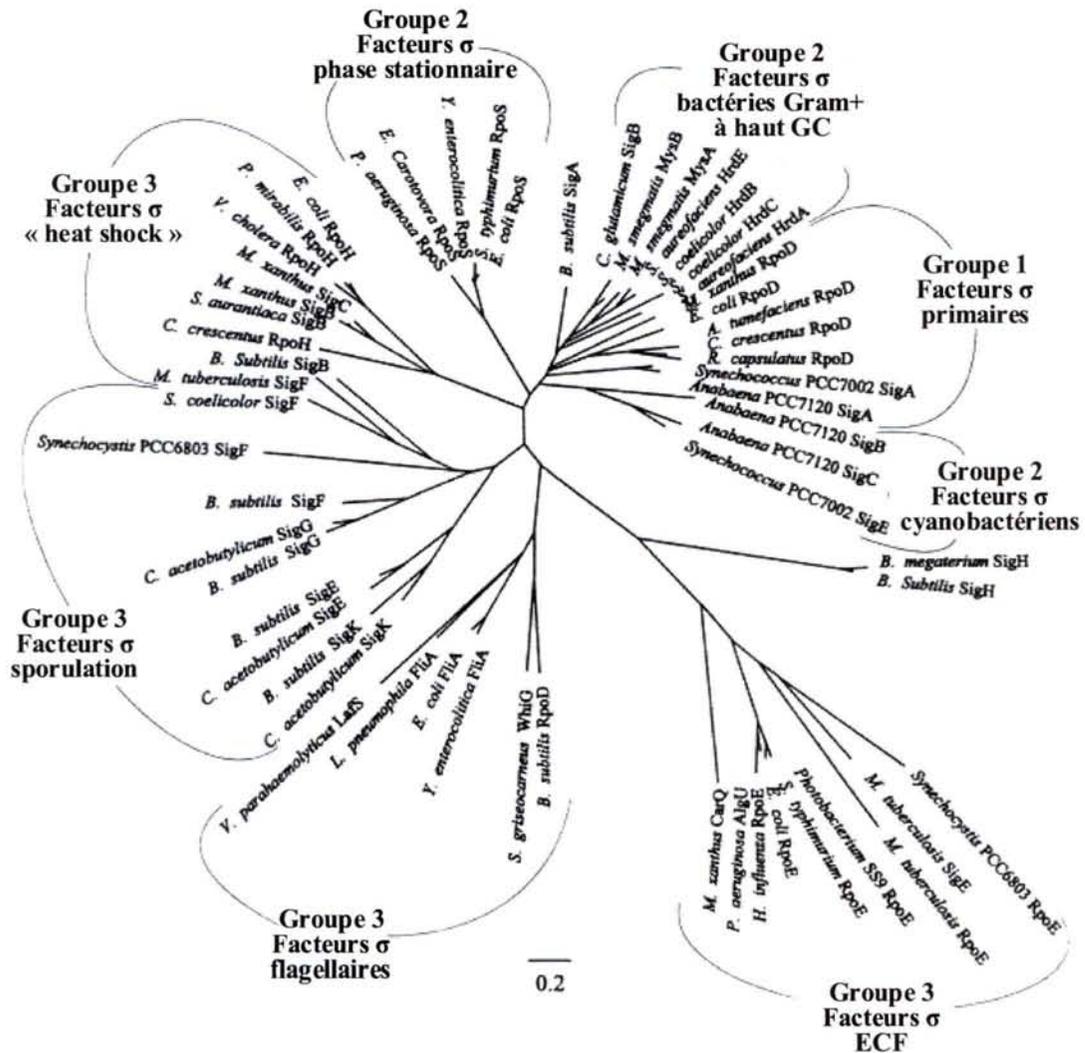


Figure 7 :

Réseau phylogénétique des facteurs σ de la famille des facteurs σ^{70} . Il a été réalisé après alignement de séquences répertoriées dans Genbank (Wosten, 1998). L'échelle représente 0,2 substitutions par base.

Toutes les bactéries contiennent au moins un facteur σ de cette famille. Ce nombre peut varier de 1 chez *Mycoplasma genitalia*, à 7 chez *E. coli* et à plus de 60 chez *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 1995; Ishihama, 2000). La classe des σ^{54} n'est pas divisée en sous-groupes et a été identifiée chez la plupart des bactéries. Ces facteurs σ , dispensables dans certaines conditions de croissance, sont homologues au facteur σ de 54 kDa d'*E. coli*, impliqué dans l'assimilation de l'azote (Merrick, 1993).

La comparaison de séquences des protéines appartenant à la famille des facteurs σ^{70} , chez différentes espèces bactériennes, a permis la mise en évidence de 4 régions très conservées en acides aminés, elles-mêmes pouvant être subdivisées en sous-régions (figure 8) (Helmann & Chamberlin, 1988). La région 1 est la région la moins conservée entre les différents facteurs σ et serait nécessaire à la formation du complexe ouvert lors de l'initiation de la transcription (Wilson & Dombroski, 1997). La région 2.1 est nécessaire à l'interaction du facteur σ avec le noyau de l'ARN polymérase. Les régions 2.1 et 2.3 sont impliquées dans l'ouverture de l'ADN double brin pour la transcription. La région 2.4 permet la reconnaissance de la région -10 du promoteur (Checroun *et al.*, 2004; Waldburger *et al.*, 1990) et la région 2.5 est impliquée dans la reconnaissance de la séquence consensus du promoteur -16 chez *B. subtilis* et *E. coli* (Voskuil *et al.*, 1995). La région 3.1 présente des motifs de liaison à l'ADN et la région 4.1 peut se lier à certains facteurs transcriptionnels (Li *et al.*, 1994). Enfin, la région 4.2 participe à la reconnaissance de la séquence promotrice -35 (Checroun *et al.*, 2004; Dombroski *et al.*, 1993).

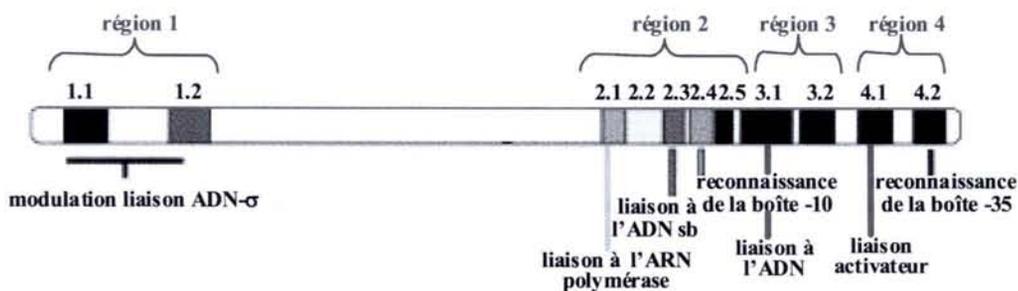


Figure 8 :

Organisation structurale des facteurs σ de la famille des facteurs σ^{70} . Les quatre régions conservées entre les facteurs σ ainsi que les sous-régions et la fonction connue, assurée par chaque domaine, sont indiquées.

4.2.1.2. Les facteurs anti-sigma et anti-anti-sigma

L'expression des facteurs σ alternatifs, activés par des signaux spécifiques ou lors de conditions de stress et appartenant à la famille des facteurs σ^{70} , peut être régulée au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel. Un mécanisme de régulation fréquent est l'interaction du facteur σ avec une protéine inhibitrice nommée anti- σ (Brown & Hughes, 1995). La liaison entre les facteurs σ et anti- σ s'établirait par interaction entre la région conservée 4.2 du facteur σ et l'anti- σ et serait réversible (Tam *et al.*, 2002). Les facteurs anti- σ décrits interviennent lors de la sporulation, de la formation des flagelles, de stress et dans les fonctions extracytoplasmiques.

Chez *S. typhimurium*, l'activité de σ^{28} (ou σ^F), codé par le gène *fliA*, est régulée par le facteur anti- σ FlgM (Kutsukake & Iino, 1994). Cette protéine se lie à σ^{28} et bloque son activité. L'expression des gènes flagellaires tardifs (codant la flagelline et les fonctions de chimiotactisme) dépend de σ^{28} . Lors des étapes précoces de la biosynthèse de flagelle, le facteur σ^{28} est inactivé par association avec FlgM. Quand le crochet et le corps basal sont formés, FlgM est sécrétée par le système d'export du flagelle, libérant ainsi σ^{28} . Une telle régulation est retrouvée chez de nombreuses autres espèces bactériennes. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'expression d'AlgU, un facteur σ de type ECF, qui contrôle la biosynthèse d'alginate, est régulée par l'anti- σ MucA (Martin *et al.*, 1993). Par ailleurs, σ^E , un facteur impliqué dans le choc thermique, est régulé négativement par RseB et le facteur anti- σ RseA. RseA est une protéine de la membrane interne dont le domaine cytoplasmique se lie au facteur σ^E et inhibe l'activité de ce dernier. RseB est une protéine périplasmique qui interagit spécifiquement avec le domaine C terminal de RseA (De Las Penas *et al.*, 1997).

Chez *B. subtilis*, trois facteurs σ sont régulés négativement par un facteur anti- σ . La formation de spores est contrôlée par un facteur anti- σ , SpoIIAB, qui interagit avec σ^F , impliqué dans les étapes précoces de la sporulation, et σ^G , impliqué dans les étapes plus tardives. L'expression de σ^G est nécessaire à l'activité de σ^F et SpoIIAB inhibe l'activité de ces deux facteurs σ dans la présore (Min *et al.*, 1993; Rather *et al.*, 1990). Un autre facteur anti- σ , RsbW, régule négativement σ^B , un facteur sigma général dans la réponse au stress. Cet anti- σ est lié à σ^B lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (Boylan *et al.*,

1992; Voelker *et al.*, 1996). La régulation de l'activité de ces deux facteurs anti- σ , SpoIIAB et RsbW, est similaire et implique un facteur régulateur nommé anti-anti- σ . L'activité de SpoIIAB et RsbW est dépendante de l'état de phosphorylation des facteurs anti-anti- σ respectifs, SpoIIAA et RsbV et par conséquent du ratio ATP/ADP de la cellule. En condition d'excès d'ATP, l'anti- σ peut se lier au facteur σ , empêchant ainsi la sporulation dans le cas de SpoIIAB et la réponse au stress pour RsbW. En condition d'excès d'ADP, SpoIIAB et RsbW se lient à leur anti-anti- σ respectifs déphosphorylés, libérant ainsi le facteur σ (Diederich *et al.*, 1994; Magnin *et al.*, 1996). Chez *S. coelicolor*, la protéine codée par le gène *bldG* qui appartient à la classe des gènes *bld* et dont l'expression est nécessaire pour la formation des hyphes aériens, présente des similarités avec SpoIIAA et RsbV de *B. subtilis*. De plus, il a été montré que l'activité de BldG est également modifiée par phosphorylation (Bignell *et al.*, 2003).

4.2.2. Rôle des facteurs sigma dans la réponse aux stress

Quand les bactéries sont exposées à des températures élevées ou aux stress environnementaux tels que des stress dus à l'éthanol, aux métaux lourds ou au peroxyde d'hydrogène, la transcription de certains gènes va être totalement réorganisée. En fait, un changement dans l'activité de certains facteurs σ se produit et conduit à des modifications de l'activité de l'ARN polymérase. Lors de la réponse à un choc thermique, la synthèse de certaines protéines est stoppée ou diminuée et de nouvelles protéines, produits des gènes nommés « heat shock », sont synthétisées.

Chez *E. coli*, lors de la réponse au choc thermique, une vingtaine de protéines sont ainsi produites suite à des changements transcriptionnels. Le facteur σ^{32} , produit du gène *rpoH*, reconnaît les séquences consensus du promoteur de ces gènes et permet leur transcription (Yura *et al.*, 1993). La réponse au choc thermique résulte de l'augmentation de la quantité de facteur σ^{32} lorsque la température augmente et de la diminution de σ^{32} lorsque la température baisse. Le signal qui induit la synthèse de ce facteur sigma est l'accumulation de protéines partiellement dénaturée, résultat de l'augmentation de température. Chez *B. subtilis*, trois classes de protéines « heat shock » ont été identifiées (Hecker *et al.*, 1996). Les protéines de la classe II, la classe la plus représentée, sont régulées par le facteur σ^B . Ce facteur sigma est qualifié de facteur général de la réponse au stress. En effet, les protéines

régulées par σ^B ne sont pas induites uniquement par un choc thermique mais également par d'autres stress tels que l'alcool, la carence en azote ou le stress osmotique. Ainsi, plus de 40 protéines régulées par ce facteur sigma sont impliquées dans l'adaptation aux conditions de stress et de carence (Volker *et al.*, 1994). Des homologues de σ^B sont retrouvés chez d'autres espèces bactériennes : σ^B chez *Staphylococcus aureus*, σ^H chez *S. coelicolor* ou σ^F chez *S. coelicolor* et chez *Mycobacterium* (DeMaio *et al.*, 1997; Gaidenko & Price, 1998; Kelemen *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1996).

Un autre type de facteur sigma peut jouer un rôle important lors de la carence azotée. Il s'agit du facteur σ^{54} , codé par *rpoN* et initialement identifié chez *E. coli* (Merrick, 1993). Le facteur σ^{54} peut être utilisé lorsque l'ammoniac est absent du milieu de culture. Des homologues en séquence de ce facteur sigma sont retrouvés chez de nombreuses autres bactéries, telles que *Pseudomonas putida*, *M. xanthus*, *Bradyrhizobium japonicum* ou *S. typhimurium* (Hirschman *et al.*, 1985; Keseler & Kaiser, 1997; Kullik *et al.*, 1991; Perez-Martin & de Lorenzo, 1995). Il représente un mécanisme de réponse conservé au cours de l'évolution.

4.2.3. Rôle des facteurs sigma dans la sporulation

En réponse à des conditions défavorables, la plupart des bactéries entre dans un état de résistance aux stress associé à une réduction de l'activité métabolique. Cependant, d'autres genres bactériens tels que *Bacillus*, *Clostridium* ou *Streptomyces* se différencient en spores hyper-résistantes. Le processus de sporulation utilise une cascade de régulation qui met en jeu de nombreux facteurs σ .

Le processus de sporulation chez *B. subtilis* comme chez *Clostridium* met en place une structure particulière constituée de deux compartiments appelés cellule mère et préspore (Woods & Jones, 1986). Chez *B. subtilis*, la formation de spores est contrôlée par une cascade complexe impliquant six facteurs σ : σ^A , σ^H , deux facteurs σ spécifiques de la cellule mère (σ^E et σ^K) et deux facteurs σ spécifiques de la préspore (σ^F et σ^G). Les facteurs σ^A et σ^H jouent un rôle dans le déclenchement de la sporulation. Les autres facteurs σ sont activés de façon séquentielle dans leur compartiment et régulent les gènes spécifiques nécessaires pour l'assemblage de la spore (Losick & Stragier, 1992). L'activation séquentielle de ces facteurs

σ , aussi bien en terme de moment qu'en terme de localisation, et les principaux changements entraînés sont schématisés dans la figure suivante.

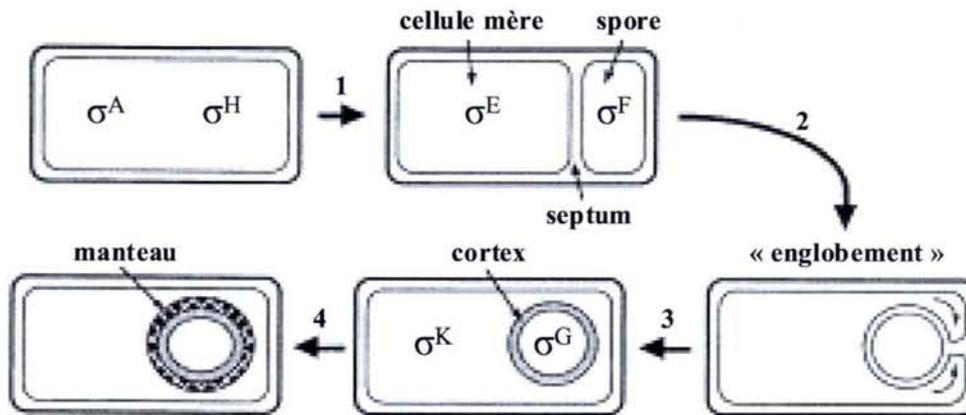


Figure 9 :

Cascade de régulation de facteurs σ durant la sporulation de *B. subtilis* (d'après Kross *et al.*, 1999). En 1 : l'expression des gènes sous le contrôle des facteurs σ^A et σ^H entraîne la formation d'un septum, en position asymétrique. En 2 : le facteur σ^F devient actif dans la spore et le facteur σ^E dans la cellule mère. Le septum migre et provoque l'« englobement » de la spore dans une double membrane. En 3 : le facteur σ^G devient actif dans la spore, générant ainsi un signal qui active le facteur σ^K dans la cellule mère. Le cortex est alors synthétisé entre les deux membranes entourant la spore. En 4 : les produits des gènes transcrits par σ^K et par σ^E s'assemblent à la surface de la spore et forment ainsi le manteau.

Le processus de sporulation est différent chez *Streptomyces*. Une limitation en nutriments dans le milieu va induire la formation d'un mycélium aérien constitué d'hyphes aériens qui vont d'abord se compartimenter et ensuite se différencier en exospores. Chez *S. coelicolor*, les facteurs σ^{WhiG} et σ^F sont nécessaires pour la régulation du processus de sporulation des hyphes (Kelemen *et al.*, 1996). Le facteur σ^{WhiG} joue un rôle important dans l'initiation de la sporulation et active plusieurs gènes spécifiques de la sporulation nommés *whi*. Le facteur σ^F contrôle les étapes tardives de la différenciation des spores.

4.2.4. Rôle du ppGpp dans la compétitivité entre facteurs sigma

Lors de l'entrée en phase stationnaire ou lors d'une carence nutritive, la réponse stringente est induite et, par l'intervention du ppGpp ainsi produit, la transcription de nombreux gènes est modulée de façon positive ou négative. Par ailleurs, dans ce contexte, la transcription des régulons du choc thermique et de la réponse générale aux stress est régulée par les facteurs σ respectifs, σ^{32} et σ^S . En fait, il a été montré que le ppGpp facilite la liaison de ces facteurs σ sur le noyau de l'ARN polymérase, en régulant la compétitivité entre différents facteurs σ et plus particulièrement entre le facteur général σ^{70} et les facteurs alternatifs σ^{32} et σ^S (Jishage *et al.*, 2002). Les auteurs ont observé que les facteurs σ alternatifs entraient plus facilement en compétition avec le facteur σ^{70} en présence de ppGpp. De plus, la quantité de facteurs σ^{32} et σ^S liés à l'ARN polymérase est diminuée pendant la phase stationnaire dans des cellules déficientes dans la production de ppGpp (Jishage *et al.*, 2002). Le ppGpp déstabilise l'interaction du facteur σ^{70} avec le noyau de l'ARN polymérase et augmente ainsi la possibilité de remplacer un facteur σ par un autre. Par conséquent, en modifiant l'affinité des facteurs σ pour la fixation sur l'ARN polymérase, les facteurs σ alternatifs présentent ainsi une plus grande opportunité pour se fixer et former l'holoenzyme nécessaire pour la transcription de gènes spécifiques.

4.3. La mort cellulaire programmée : un mécanisme de survie

4.3.1. Le concept de mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée fait référence à un processus génétique déterminé de suicide cellulaire activé en réponse à un stress ou à des signaux de développement chez les organismes multicellulaires. Pendant longtemps, ce phénomène, encore appelé apoptose, était associé uniquement aux organismes eucaryotes. Chez ces derniers, la mort cellulaire programmée participe à l'élimination de certaines cellules lors du processus de développement et à l'éradication de cellules défectueuses générées par des infections microbiennes, des transformations cancéreuses ou des facteurs létaux tels que la chaleur, les mutagènes et les oxydants. Ces facteurs vont endommager les cellules et le signal reconnu par des récepteurs va déclencher une cascade de transduction de signaux permettant l'activité

finale de protéases appelées caspases qui vont participer à la désorganisation de ces cellules et par conséquent à la mort de celles-ci (Metzstein *et al.*, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998). Des études récentes ont montré que la mort cellulaire programmée pouvait être induite par des conditions de stress ou par des facteurs du processus de développement également chez les bactéries et qu'elles n'étaient pas, par conséquent, un phénomène spécifique du monde eucaryote (Hochman, 1997; Lewis, 2000).

La mort cellulaire programmée joue un rôle primordial pour l'adaptation et la survie des bactéries lors des changements de l'environnement. En effet, la mort d'une partie de la population suite à une limitation en nutriments, à un environnement défavorable ou à une exposition à un agent toxique pourrait augmenter la possibilité de survie du restant de la population. Par ailleurs, il apparaît de nos jours que les bactéries ne vivent pas de façon isolée mais, au contraire, vivent et meurent dans une communauté complexe qui présente des similarités avec un organisme multicellulaire. En effet, certaines bactéries, telles que *Streptomyces* ou *Myxococcus*, présentent un développement complexe impliquant respectivement un mycélium ou un corps de fructification et peuvent ainsi être considérées comme des organismes multicellulaires. De plus, le phénomène de « quorum sensing », déclenché par la présence de phéromones, est un mécanisme de communication entre bactéries (Fuqua & Greenberg, 1998). Des composés réactifs oxygénés provoquent une auto-agrégation des cellules d'*E. coli*, aboutissant à une protection mutuelle entre cellules (Budrene & Berg, 1991). Enfin, certaines espèces bactériennes peuvent former une structure complexe appelée biofilm, considérée comme un mode de vie en communauté (Costerton *et al.*, 1999). Ainsi, la mort des bactéries peut apporter un avantage dans une communauté de cellules. Par exemple, elle pourrait limiter la propagation d'une infection virale et lors de certaines carences, les nutriments libérés par les cellules lysées peuvent être utilisés par les cellules voisines pour leur survie.

4.3.2. La mort cellulaire programmée au cours du développement des bactéries

4.3.2.1. Lors de la sporulation

Au cours du processus de sporulation de *B. subtilis*, un programme complexe de mort cellulaire se met en place pour la lyse de cellule mère et la libération de la spore néoformée. Cette lyse est déclenchée par la production de trois autolysines (CwlB, CwlC et CwlH), sous le contrôle du facteur σ^K (Nugroho *et al.*, 1999). Ce facteur est le régulateur final de la cascade complexe de régulation impliquant plusieurs facteurs σ , le premier étant le facteur transcriptionnel SpoOA, activé par des signaux extracellulaires déclencheurs de la sporulation. Par ailleurs, l'activation des autolysines par σ^K requiert l'activateur transcriptionnel GerE. Ainsi, σ^K est responsable à la fois de la formation du cortex et de la paroi de la spore et de la lyse cellulaire. La germination de la spore nécessite la présence dans le milieu d'une importante source de nutriments. Ainsi, la lyse de la cellule mère pourrait non seulement libérer l'endospore, mais aussi permettre d'apporter les nutriments requis à la germination de celle-ci (Lewis, 2000).

Streptomyces est une bactérie filamenteuse qui présente un cycle de développement complexe sur milieu solide. Pendant le cycle de vie de cet organisme, la majorité des hyphes vont dégénérer et mourir et les autres se différencient en chaînes de spores. Chez *S. antibioticus*, il a été mis en évidence, par observation en microscopie électronique à balayage et à transmission, un processus complexe de dégénérescence des hyphes (Miguel *et al.*, 1999). Au cours du développement de la colonie, les hyphes amenés à mourir présentent une désorganisation de la structure du nucléoïde, qui passe d'un état condensé à un état plus relâché, une dégradation du contenu cytoplasmique et une rétraction de la membrane plasmique sans lyse de la paroi cellulaire. De plus, chez cette espèce, la mort des hyphes est génétiquement programmée tant au niveau spatial que temporel. En effet, la mort se déclenche dans un premier temps uniquement dans le mycélium végétatif à partir de 48 heures de croissance (temps correspondant au début de la formation du mycélium aérien) et dans un deuxième temps uniquement dans le mycélium aérien à partir de 72 heures de croissance (temps correspondant au début de la sporulation) (Miguel *et al.*, 1999).

4.3.2.2. Lors du développement du corps de fructification

Un programme de mort cellulaire se met en place pendant le développement du corps de fructification et de la sporulation chez les myxobactéries (Rosenbluh & Rosenberg, 1990). Des autocides incluant des acides gras comme la glucosamine induisent l'autolyse dans une culture dense de *M. xanthus*. Ces substances lysent les cellules de cette bactérie mais ne présentent aucune activité toxique pour d'autres bactéries. Par ailleurs, cette autolyse massive résulterait en la perte de 65 à 90 % des cellules végétatives (Janssen & Dworkin, 1985). Une telle lyse pourrait être interprétée comme une forme de « suicide altruiste » ; les cellules lysées relargueraient des nutriments pouvant être utilisés pour nourrir le corps de fructification et les spores en formation (Lewis, 2000).

4.3.2.3. Lors de la formation d'un biofilm

Sur une surface adaptée, les bactéries peuvent croître en biofilm, c'est-à-dire en une structure multicellulaire, constituée de microcolonies (Stoodley *et al.*, 2002). Plusieurs types de biofilms ont été décrits, incluant ceux d'*E. coli*, de *P. aeruginosa*, de *Vibrio cholerae*, de *Burkholderia cepacia* ou d'*Aeromonas hydrophila* (Danese *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 2002; Watnick & Kolter, 1999). Le rôle écologique et physiologique des microcolonies de biofilms demeure inconnu. Toutefois, il a été montré que des signaux entre cellules sont impliqués dans le développement des biofilms chez *P. aeruginosa*, *B. cepacia* et *A. hydrophila* (Davies *et al.*, 1998). Un phénomène d'autolyse correspondant à un mécanisme de mort cellulaire programmée a été observé chez *P. aeruginosa* (Berk, 1963). Par ailleurs, il a été montré que la mort cellulaire a lieu de façon organisée tant au niveau spatial que temporel. Après 12 jours de croissance, plus de 50 % des microcolonies meurent et sont lysées dans leur centre (Webb *et al.*, 2003). Le mécanisme d'autolyse observé dans ce type de biofilm semble similaire à celui observé pendant le développement du corps de fructification de *M. xanthus*. L'expression du facteur σ^{RpoN} , qui transcrit les gènes impliqués dans la synthèse de flagelles et de pili de type IV chez *P. aeruginosa*, est nécessaire pour le phénomène de mort cellulaire programmée. Par ailleurs, ces structures peuvent être des récepteurs pour certains bactériophages. Ainsi, les auteurs

suggèrent que la mort cellulaire programmée chez cette espèce serait induite par l'infection par des phages (Webb *et al.*, 2003).

4.3.2.4. Changement morphologique spécifique

Lorsque les conditions environnementales sont défavorables, par exemple lors d'une augmentation de la température, d'une carence en nutriment ou de la présence d'antibiotiques, les cellules d'*H. pylori* passent d'une forme morphologique hélicoïdale à une forme de coque (Kusters *et al.*, 1997). Les auteurs ont montré que sous la forme de coque, la bactérie ne peut plus croître. Par ailleurs, il a également été observé pour cette forme une perte du potentiel membranaire, une diminution de la quantité d'ARN et d'ADN et une digestion spontanée de l'ADN (Cellini *et al.*, 2001). Ainsi, le passage de la forme hélicoïdale à une forme de coque serait un changement morphologique déclenché par un programme de mort cellulaire.

4.3.3. Aspects génétiques de la mort cellulaire programmée

Chez les bactéries, un des systèmes génétiques bien caractérisé qui conduit à la mort cellulaire programmée est le système de modules bactériolytiques porteurs d'un couple de gènes codant une toxine et une antitoxine (Engelberg-Kulka & Glaser, 1999). Certains de ces modules sont portés par des éléments extrachromosomiques comme les plasmides. Après ségrégation, les cellules qui ont perdu le plasmide sont tuées par l'effet de la toxine. En effet, la toxine est une protéine stable, à longue durée de vie et est exprimée faiblement dans la cellule alors que l'antitoxine est une protéine labile, produite à niveau élevé et qui présente une courte durée de vie. Lorsque les cellules perdent le plasmide, l'antitoxine est rapidement dégradée et la présence de la toxine stable provoque la mort cellulaire de celles-ci (Engelberg-Kulka & Glaser, 1999).

Des homologues à ces modules sont retrouvés au sein du chromosome de certaines espèces bactériennes (Gotfredsen & Gerdes, 1998; Mittenhuber, 1999). Chez *E. coli*, le système MazEF est induit par une limitation en nutriments ou une exposition à des antibiotiques. MazF est la protéine toxique et l'antagoniste MazE est la protéine antitoxique (Sat *et al.*, 2001). MazF est une protéine stable à longue durée de vie alors que MazE est labile et peut être dégradée par la protéase ClpPA. En condition de stress, l'expression de la

protéase est activée par le ppGpp, signal intracellulaire de la réponse stringente. Par conséquent, la protéine MazE est rapidement dégradée et, ne pouvant plus former de complexe avec MazF, cette dernière, libérée, provoque la mort cellulaire en empêchant l'initiation de la réplication et la traduction (Engelberg-Kulka & Glaser, 1999).

L'expression génique peut être contrôlée au niveau traductionnel, notamment par les ARN antisens. Un ARN antisens interagit avec un ARN cible pour empêcher sa traduction *via* de nombreux mécanismes incluant la séquestration de la région d'initiation de la traduction, la dégradation accélérée de l'ARNm ou la destruction de l'ARN cible (Eguchi *et al.*, 1991). Des systèmes génétiques provoquant la mort cellulaire utilisent des mécanismes impliquant des ARN antisens (Gerdes *et al.*, 1997). Il s'agit plus particulièrement des systèmes *hok/sok* et *pnd* portés, respectivement, par les plasmides R1 et R483. Après ségrégation cellulaire, les cellules qui perdent un tel plasmide sont tuées (Gerdes *et al.*, 1992). Les loci de ces plasmides codent un ARNm très stable pouvant être traduit en protéines membranaires toxiques pour la cellule, nommées Hok et PndA. Cependant, la traduction de *hox* et *pndA* est régulée par un petit ARN antisens instable appelé respectivement *sok* et *pndB* et complémentaire aux régions leader des ARNm *hok* et *pndA* (Gerdes *et al.*, 1992). Une fois le système perdu, l'ARN antisens est rapidement dégradé et l'expression des protéines toxiques est alors possible.

Le locus entéricidine, identifié chez *E. coli* et *Citrobacter freundii*, code un système de toxine/antitoxine sans homologie avec les modules bactériolytiques décrits précédemment (Bishop *et al.*, 1998). Ce locus est contrôlé positivement par le facteur σ de la phase stationnaire nommé RpoS et négativement par le système à deux composantes EnvZ/OmpR. Les deux gènes de ce locus, *ecnA* et *ecnB*, codent respectivement l'antitoxine et la toxine. Ces protéines sont des lipoprotéines de l'enveloppe cellulaire. Pendant la phase stationnaire et sous forte osmolarité, la lyse de la bactérie est provoquée par la forte activation de *ecnB* (Bishop *et al.*, 1998). Contrairement aux autres systèmes décrits précédemment où la mort cellulaire est due à la dégradation de l'antitoxine labile, la mort cellulaire induite par ce système est provoquée par l'activation de la synthèse de la toxine.

Ainsi, des caractéristiques morphologiques et moléculaires démontrent l'existence de programme de mort cellulaire chez les bactéries en réponse à une variété de stress et en réponse à des facteurs impliqués dans le développement morphologique.

5. Objectif du travail : recherche du contrôle génétique chez *Streptomyces ambofaciens* via l'étude de gènes mutables

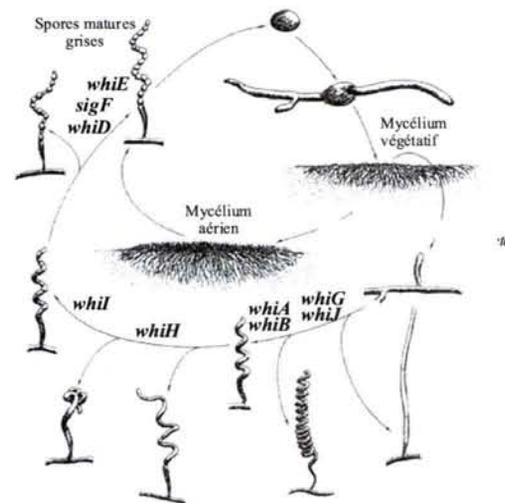
5.1. Aspects morphologiques et physiologiques des *Streptomyces*

5.1.1. Cycle de développement complexe sur milieu solide

Les *Streptomyces* appartiennent à la famille des Actinomycètes, bactéries à coloration Gram positive, dont l'habitat naturel est le sol. Leur cycle de développement est complexe et aboutit à un organisme différencié morphologiquement. Le développement d'une colonie sur milieu solide débute par la germination d'une spore qui conduit à la formation d'un mycélium végétatif constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ramifiés, rampants et multigénomiques. Puis, des hyphes aériens non ramifiés se développent en utilisant comme substrat le mycélium végétatif. Après arrêt de l'extension des hyphes aériens, les filaments se subdivisent pour former des chaînes de spores unigénomiques (Chater, 1998).

Un métabolisme secondaire qui caractérise la différenciation physiologique se met en place lors de l'entrée en phase stationnaire ou au début de la différenciation du mycélium aérien. La différenciation physiologique correspond à la synthèse de produits non essentiels pour la croissance normale de la bactérie. Les bactéries du genre *Streptomyces* produisent environ 60 % des antibiotiques bactériens connus. De plus, des pigments, des anabolisants, des immunosuppresseurs, des anticancéreux, des insecticides ou des herbicides sont également produits (Bibb, 1996; Thompson *et al.*, 2002). Les gènes de biosynthèse des antibiotiques sont regroupés sur le chromosome sous forme de cluster. En général, ces gènes sont associés à au moins un gène de résistance à cet antibiotique et au gène de régulation de sa production. Cette organisation est retrouvée par exemple pour la synthèse d'actinorhodine chez *S. coelicolor* et pour celle de la spiramycine chez *S. ambofaciens* (Fernandez-Moreno *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1990).

Figure 11 :
Représentation de la métamorphose progressive d'une hyphe aérienne en chaîne de spores. Le moment où les gènes *bld* et *whi* sont actifs au cours du développement est indiqué (d'après Chater *et al.*, 1998).



5.1.3. Les gènes *whi* impliqués dans le processus de sporulation

Les gènes *whi* qui sont impliqués dans le processus de sporulation chez *S. coelicolor* peuvent être qualifiés de gènes précoces ou gènes tardifs. Au moins six gènes *whi* (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* et *whiJ*), appelés gènes précoces, jouent un rôle dans les premières étapes du processus de sporulation et sont en fait nécessaires pour la septation des hyphes aériens (figure 12) (Chater, 1972; Chater, 2001). Par ailleurs, au moins six gènes (*sigF*, *whiD*, *whiE*, *whiL*, *whiM* et *whiO*) sont qualifiés de tardifs (Chater, 2001). Ces gènes interviennent dans la maturation des spores, comme indiqué dans la figure 12. Par contre, les gènes *whiK* et *whiN* sont qualifiés de gènes indéterminés car leur rôle au cours de la différenciation du mycélium aérien n'a pas été encore déterminé (Molle & Buttner, 2000). La fonction des gènes *whiA*, *whiJ*, *whiL*, *whiM* et *whiO* reste encore inconnue. Le cluster *whiE* code une polycétone synthétase de type II qui permet la production du pigment gris associé aux spores (Davis & Chater, 1990). *WhiB* et *WhiD* sont deux protéines de liaison à l'ADN (Davis & Chater, 1992; Molle *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré que *WhiB* contrôle positivement l'expression de *whiE* (Davis & Chater, 1992). Les gènes *whiH*, *whiI* et *whiJ* codent des protéines régulatrices, *WhiH* ayant un rôle de répresseur (Ainsa *et al.*, 1999; Molle & Buttner, 2000; Ryding *et al.*, 1998). Enfin, les gènes *whiG*, *sigF* et *whiN* codent des facteurs σ (Bibb & Buttner, 2003; Chater *et al.*, 1989; Potuckova *et al.*, 1995). Ces facteurs σ appartiennent à la famille des facteurs σ^{70} décrite précédemment. Il a été montré que le facteur σ^{SigF} régule les étapes tardives de la sporulation et que son expression requiert la présence des six protéines

5.2. Instabilité génétique décrite chez les *Streptomyces*

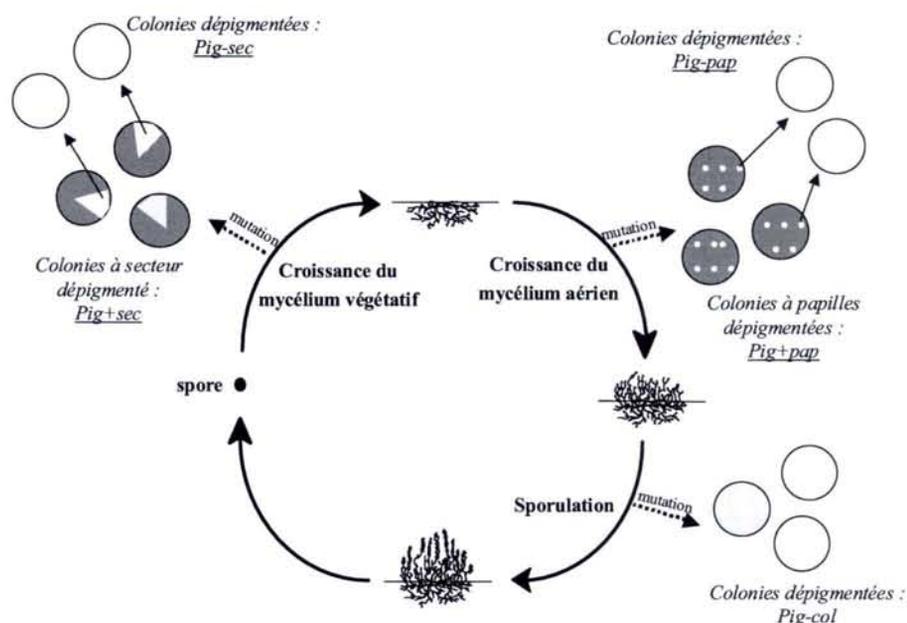
Les *Streptomyces* présentent une instabilité génétique caractérisée par l'apparition à haute fréquence (de 0,1 % à 1 %) de mutants affectés dans un ou plusieurs caractères qui, dans la plupart des cas, appartiennent au métabolisme secondaire comme la production de pigment, de mycélium aérien, la sporulation ou la production d'antibiotiques. Cette instabilité génétique s'accompagne généralement d'une instabilité génomique caractérisée par des réarrangements chromosomiques de grande taille tels que des délétions pouvant être associées à des amplifications. Il a été montré qu'un quart du génome (soit environ 2000 kb) pouvait être délété sans que la viabilité des mutants ne soit affectée. Cette région a donc été qualifiée d'instable (Leblond *et al.*, 1991). Ces réarrangements génomiques pouvant affecter la structure du chromosome de cette bactérie sont localisés au niveau des extrémités du chromosome dans la région instable. Cette région, séquencée chez *S. coelicolor*, est dépourvue de gènes de ménage et contient par contre de nombreux gènes pouvant être qualifiés de mutables ou de contingence (Redenbach *et al.*, 1996).

5.3. La pigmentation est un caractère instable chez *S. ambofaciens*

Chez *S. ambofaciens*, espèce étudiée au laboratoire, la pigmentation des colonies est un caractère mutable. Dans la descendance d'une colonie présentant une pigmentation grise qualifiée de sauvage, différents phénotypes mutants sont distingués et apparaissent à haute fréquence (de l'ordre de 1 %). Des colonies totalement dépigmentées (appelées Pig-col), des colonies grises à secteur dépigmenté (appelées Pig+sec) et des colonies grises à papilles blanches (appelées Pig+pap) sont observées (figure 13). Les mutants issus de secteurs ou de papilles sont appelés respectivement Pig-sec et Pig-pap (figure 13) (Martin *et al.*, 1998). Bien que les mutants Pig-col et Pig-sec présentent une déficience pour la production de pigment, cette déficience est variable d'un mutant à un autre et la majorité d'entre-eux sporule. Les mutants Pig-pap présentent tous un phénotype totalement dépigmenté et une grande majorité d'entre eux ne sporule pas (48/49 mutants analysés) (Martin *et al.*, 1998). Etant donné le développement complexe d'une colonie de *Streptomyces*, un secteur dépigmenté peut être interprété comme le résultat d'un événement mutationnel survenu lors de la différenciation du mycélium végétatif, une papille blanche comme le résultat d'une mutation apparue lors du

développement du mycélium aérien et une colonie dépigmentée pourrait résulter d'une mutation générée lors de la sporulation ou lors de la germination d'une spore.

Figure 13 :
Représentation schématique des différentes étapes du cycle de développement de *S. ambofaciens* et des phénotypes mutants observés.



Ainsi, la pigmentation des colonies est un caractère instable, hautement mutable à différents stades de développement.

5.4. Mise en place d'un état mutateur lors de la différenciation du mycélium aérien

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 caractérise par une variation des fréquences de production de mutants *Pig-col*, *Pig-sec* et *Pig-pap* et une variation des fréquences de délétion aux extrémités du chromosome suivant l'origine sauvage des mutants étudiés. L'analyse des colonies à papilles a montré que le nombre de papilles par colonie est un caractère héritable et que 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 blanches à leur surface et des mutants *Pig-col* à des

fréquences très supérieures à celle de leur ancêtre sauvage. Ces résultats ont permis de formuler l'hypothèse selon laquelle la modulation de l'instabilité génétique observée résulte 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 (Martin *et al.*, 1999).

5.5. Problématiques abordées

Dans le but d'identifier le déterminisme génétique de l'état mutateur, l'objectif de ce travail a été 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 de bons candidats pour l'identification de tels gènes.

La première stratégie choisie pour rechercher le (ou les) gène(s) cible(s) muté(s) chez ces mutants a été de tenter de compléter le phénotype mutant à l'aide d'une banque d'ADN génomique. Cette approche présentait l'avantage de ne pas faire d'hypothèse quant à la nature du gène impliqué et pouvait permettre de mettre en évidence un nouveau gène impliqué dans la différenciation morphologique.

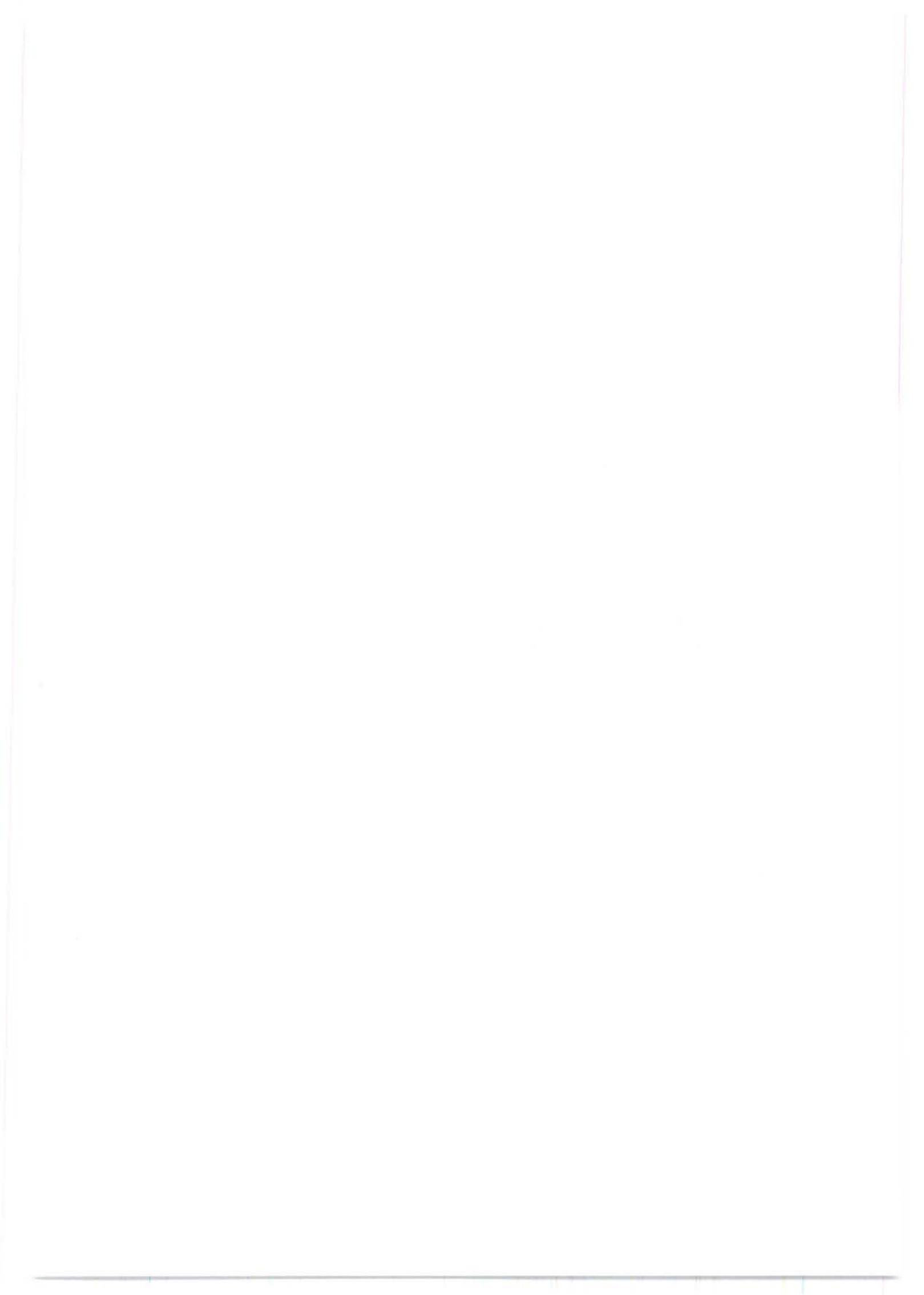
Cette approche a permis d'isoler et de caractériser d'un point de vue phénotypique et génomique la souche nommée 29C1 présentant un retour partiel de la pigmentation. Cette souche présentait d'une part une pigmentation verte, encore jamais observée chez cette espèce, et d'autre part un chromosome réarrangé dont la structure n'avait jamais encore été décrite.

La deuxième stratégie choisie pour la recherche du déterminisme génétique chez les mutants Pig-pap a été de tenter de compléter le phénotype mutant en introduisant des gènes connus chez *Streptomyces* pour intervenir dans la pigmentation et la sporulation. Il s'agit de 5 gènes *whi* (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ*) identifiés chez *S. coelicolor*.

*Cette approche a permis la complémentation du phénotype mutant après introduction du gène *whiG* dans trois mutants Pig-pap testés. L'analyse moléculaire a permis de postuler que la régulation post-transcriptionnelle de *whiG*, par exemple un régulateur de *whiG*, serait affectée chez ces mutants. De plus, pour un de ces mutants, un retour à la formation de*

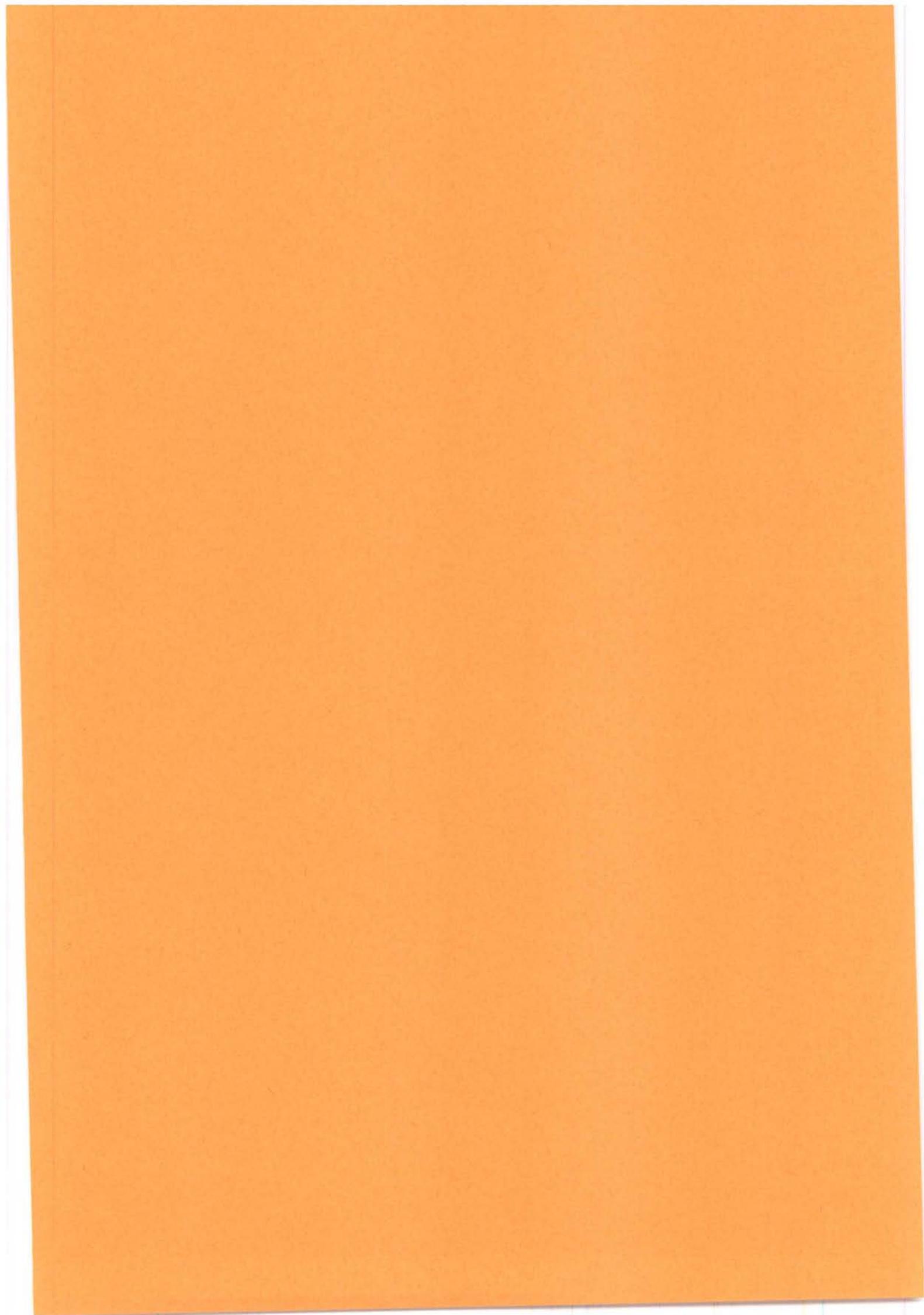
mutants après complémentation a été constaté. Ces mutants présentaient tous une mutation dans le transgène whiG suggérant que le transgène whiG est une cible mutationnelle. Le même type de résultats a été retrouvé chez S. coelicolor.

Enfin, le dernier objectif de cette thèse a été d'identifier le (ou les) facteur(s) modulant la production des mutants Pig-pap. Des expériences antérieures menées au laboratoire suggéraient que la réponse stringente induite par une carence en acides aminés *via* l'alahormone ppGpp aurait une influence sur la production de ces mutants. Ainsi, une approche choisie pour tester cette hypothèse est l'étude d'un mutant déficient dans la production de ppGpp (mutant *relA*) et la comparaison de la production de mutants dans un contexte *relA*⁺ et *relA*⁻.



II. RESULTATS

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



Les résultats font l'objet de trois affiches, trois communications orales et de deux articles dont un a été publié en 2003 dans *Archives of Microbiology* et un a été accepté pour *Research in Microbiology* en décembre 2004. Les articles correspondant sont insérés dans le manuscrit. Ces articles contenant le matériel et les méthodes employés, ces derniers ne seront donc pas redétaillés. Une synthèse des résultats présentés dans ces publications et des résultats non publiés est présentée. Les résultats non publiés font l'objet de la troisième partie de ce travail. Un troisième article décrivant ce travail est prévu. Pour cette troisième partie des résultats, les méthodes employées ayant été publiées préalablement ne seront pas développées. Par contre, le matériel utilisé, correspondant aux souches et aux différents milieux de cultures, sera précisé. Enfin, en annexe est présenté un résumé des différentes communications.

Article n°1

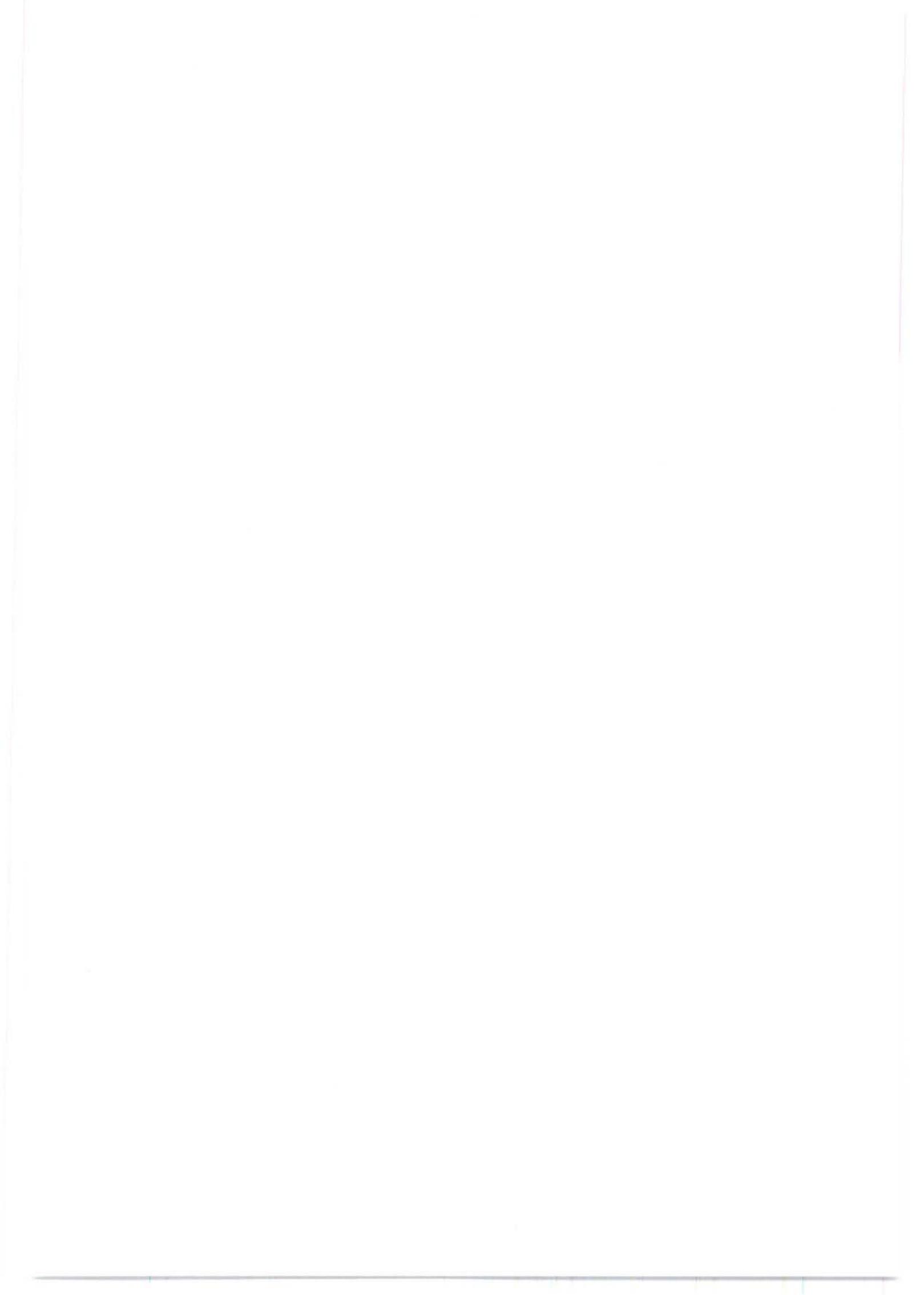
Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.

The spontaneous amplification of a sequence of the TIR is associated with the circularization of the chromosome in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.
Archives of Microbiology 2003 (179) 387-93.

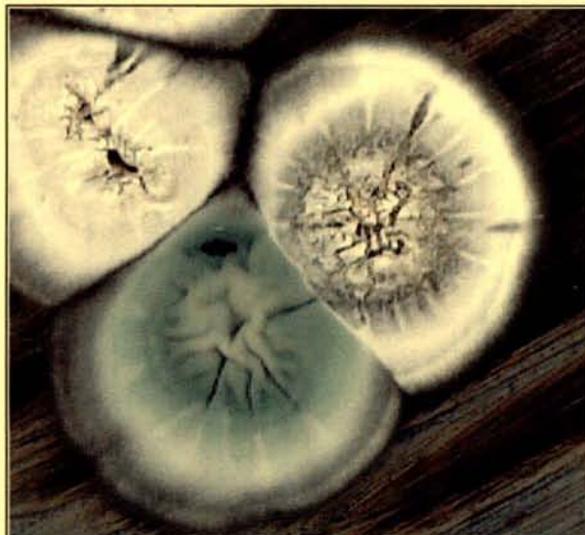
Article n°2

Catakli S., Andrieux A., Decaris B. et Dary A.

The sigma factor WhiG and its regulation are affected by a mutational phenomenon taking place during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.
Accepté pour *Research in Microbiology*.



1. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1



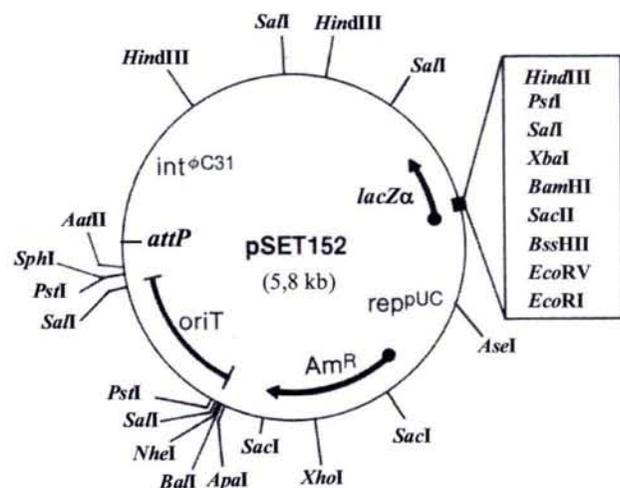
1. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1

Dans le but de rechercher le (ou les) gène(s) muté(s) chez les mutants Pig-pap, la stratégie choisie a été de tenter de compléter le phénotype mutant à l'aide d'une banque d'ADN génomique de la souche sauvage. Cette approche a permis d'isoler et de caractériser la souche 29C1 présentant un retour partiel à la pigmentation.

1.1. Isolement de la souche 29C1

Dans le but de restaurer le phénotype sauvage d'un mutant Pig⁻pap, une banque d'ADN génomique de la souche sauvage WT8 a été construite dans le plasmide conjugatif et intégratif pSET152. La carte physique et génétique de ce plasmide est présentée dans la figure 14. Ce plasmide porteur du gène de résistance à l'apramycine s'intègre au niveau du site *attB* du phage ϕ C31 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* de ϕ C31. Le transfert par conjugaison d'*E. coli* à *S. ambofaciens* se fait à partir d'une origine de transfert *oriT*. Les fonctions nécessaires au transfert sont apportées par la souche donneuse *E. coli* MRF'307. Après digestion partielle de l'ADN génomique de la souche WT8 par l'enzyme de restriction *Bam*HI, les inserts ont été clonés dans le site *Bam*HI présent sur le plasmide.

Figure 14 :
Carte de restriction du plasmide pSET152. Le gène de résistance à l'apramycine (*AmR*), l'origine de transfert (*oriT*), l'origine de réplication (*rep^{pUC}*), le gène *lacZ α* permettant l' α -complémentation et le gène codant l'intégrase de ϕ C31 sont indiqués sur cette figure (d'après Bierman *et al.*, 1996).



Afin de recouvrir l'ensemble du génome de *S. ambofaciens* avec une probabilité de 0,997, 7400 clones ont été repiqués. La taille moyenne des inserts était de 8 kb. Chaque plasmide recombinant a été introduit par conjugaison intergénérique entre différents mélanges de 24 clones d'*E. coli* MRF'307 et le mutant pap1 (anciennement appelé WT8p25).

Ce mutant a été choisi comme hôte de clonage car il ne possède pas de réarrangement génomique détectable. Il est capable de conjuguer avec *E. coli* et il présente un taux de réversion vers le phénotype sauvage inférieur à 2.10^{-5} . En effet, des hybridations notamment avec les cosmides recombinants D9 et A85, qui révèlent les régions des extrémités du chromosome les plus fréquemment délétées chez *S. ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1996), ont été réalisées sur l'ADN génomique de la souche mutante pap1. Aucune délétion n'a été détectée. De plus, le profil de restriction *AseI* obtenu après migration en PFGE est similaire à celui de la souche WT8. Par ailleurs, dans la descendance du mutant pap1, aucun révertant n'a été détecté au bout de 7 jours de croissance sur milieu HT pour 56630 colonies observées.

Le protocole de conjugaison entre *E. coli* et *Streptomyces*, utilisé pour introduire chaque plasmide recombinant dans un mutant Pig-pap, correspond à une variante du protocole décrit par Matsushima et Baltz (Matsushima & Baltz, 1996). Cinquante μ l (environ 10^6 cellules) d'une culture liquide en phase stationnaire de la souche donneuse d'*E. coli*, qui porte le plasmide à transférer, sont mélangés à 100 μ l (environ 10^5 cellules) d'une suspension de mycélium récupérée à partir d'une culture sur milieu solide de trois jours de la souche mutante de *Streptomyces*. Ce mélange est étalé sur une boîte contenant 25 ml de milieu AS-1 (Matsushima & Baltz, 1996). Après une nuit d'incubation à 30°C, les boîtes sont lavées avec 3 ml de milieu LB liquide et légèrement grattées avec une pipette pour éliminer une partie des colonies d'*E. coli*, le mycélium de *Streptomyces* restant attaché à la gélose. La souche donneuse d'*E. coli* est contre-sélectionnée par addition de 1,5 ml d'une solution contenant de l'ampicilline (à 30 μ g/ml) et de l'apramycine (à 30 μ g/ml) pour sélectionner les transconjugants. Les boîtes sont placées cinq jours à 30°C et répliquées sur milieu HT + apramycine (à 30 μ g/ml) pour l'observation des phénotypes.

132 croisements ont été réalisés, soit 3168 clones théoriquement testés. En ne considérant que les croisements où plus de 25 transconjugants ont été observés, près de 1800 clones ont été testés soit environ 25 % de la banque d'ADN génomique. Au cours de ce

criblage, une colonie de phénotype Pig-pap avec un secteur vert a été observée. Après plusieurs sous-clonages de ce secteur, pour avoir une population homogène, la souche 29C1 a été isolée. Bien qu'il n'y ait pas restauration du phénotype WT, la souche 29C1 produit à nouveau un composé pigmenté. Son étude a été poursuivie.

1.2. Analyse phénotypique de la souche 29C1

Afin de tester si la sporulation était restaurée chez la souche 29C1, les souches WT8, pap1 et 29C1 ont été cultivées sur milieu HT pendant 14 jours à 30°C. La présence de spores a été recherchée par observation des préparations sous microscope photonique, après coloration de Gram, des fragments de colonie. Alors que WT8 produit des spores, aucune spore libre n'a été observée pour les souches pap1 et 29C1. Ainsi, la souche 29C1 ne présente pas une sporulation de type sauvage.

La souche 29C1 présente une pigmentation verte qui n'avait encore jamais été observée chez *S. ambofaciens*. Le pigment vert colore les colonies et le milieu de croissance de la bactérie. L'aspect des colonies par rapport à l'intensité de la coloration, la localisation de la pigmentation sur la colonie ou l'abondance du mycélium aérien varie entre les différentes colonies de la souche 29C1. Quelques différents phénotypes de colonies observés pour la souche 29C1 sont illustrés dans la figure 15. Ces observations indiquent que le phénotype de la souche 29C1 est variable. Afin de préciser la nature de cette variabilité, la caractérisation génomique de cette souche a été entreprise.

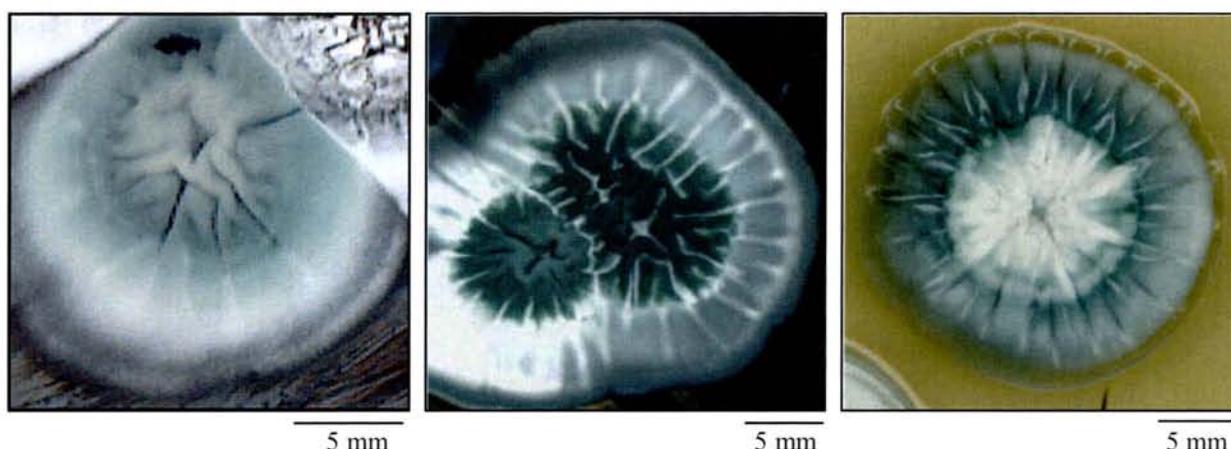


Figure 15 :

Phénotypes de différentes colonies issues de la souche *S. ambofaciens* 29C1, observés après 14 jours de croissance sur milieu HT.

1.3. Structure chromosomique de la souche 29C1

1.3.1. **Présence d'un plasmide recombinant dans le génome de 29C1**

La souche 29C1 présente dans son génome un plasmide recombinant issu de la banque d'ADN génomique de WT8. Ce plasmide nommé 29C1 porte un insert de 1,6 kb. Il a été réintroduit par conjugaison dans la souche mutante *pap1*. Sur 100 transconjugants obtenus, aucun ne présentait une pigmentation verte comme la souche 29C1. Ainsi, l'introduction du plasmide 29C1 n'explique pas à elle seule le phénotype caractéristique de cette souche.

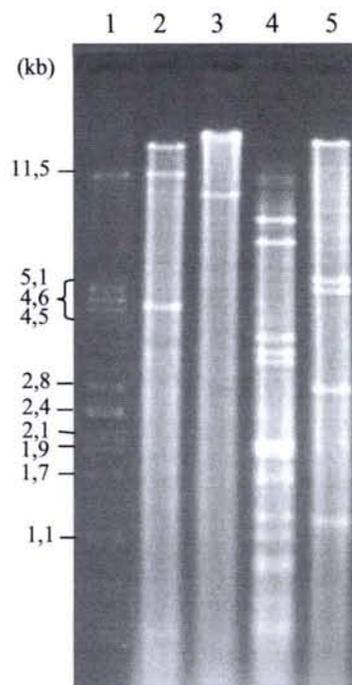
1.3.2. **Le chromosome de 29C1 porte une amplification**

1.3.2.1. *Localisation de l'amplification*

L'analyse des profils de restriction *Bam*HI, *Pvu*II, *Cla*I et *Kpn*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 16). La taille de l'ADS a ainsi pu être estimée à 37 kb.

Figure 16 :

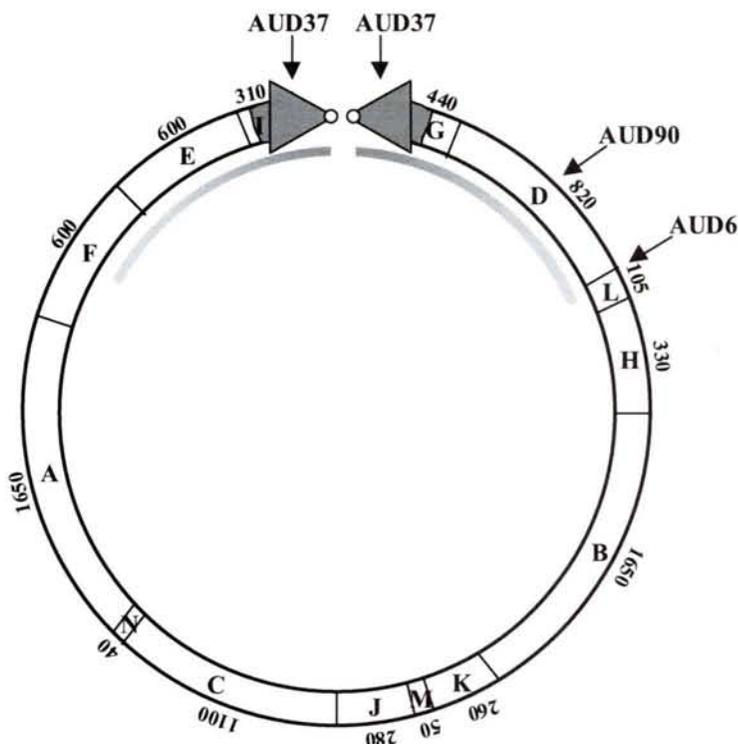
Amplification mise en évidence dans le génome de la souche *S. ambofaciens* 29C1. Profils de restriction *KpnI* (piste 2), *Clal* (piste 3), *PvuII* (piste 4) et *BamHI* (piste 5) de l'ADN génomique de la souche 29C1. La piste 1 correspond au profil de restriction *PstI* de l'ADN du bactériophage λ . La taille (en kb) des différents fragments de restriction *PstI* est indiquée.



S. ambofaciens possède un chromosome linéaire de 8000 kb caractérisé par la présence de répétitions terminales inversées de 210 kb appelées TIR pour Terminal Inverted Repeats. La majorité des amplifications analysées jusqu'à présent chez cette espèce ont pu être localisées dans deux régions situées à environ 800 kb et 1350 kb de l'extrémité du bras chromosomique droit, nommées respectivement AUD90 et AUD6 (figure 17) (Demuyter *et al.*, 1988). L'amplification détectée dans le génome de la souche 29C1 n'appartient en fait à aucune de ces deux régions. En effet, en hybridant deux cosmides, un révélant une région appartenant à l'AUD90 (23E11) et l'autre une région appartenant à l'AUD6 (2B7) (figure 18), sur un profil de restriction *BamHI* de l'ADN génomique de 29C1, les fragments correspondant à l'amplification n'ont pas été révélés. Des expériences d'hybridations réalisées avec des cosmides, issus comme les deux précédents d'une banque d'ADN génomique de la souche DSM40697 et qui révèlent des régions appartenant aux extrémités du chromosome, ont permis de montrer que l'amplification se situe en fait dans une nouvelle région amplifiable localisée dans les TIR du chromosome. Cette séquence amplifiable se trouve donc en deux exemplaires et cette nouvelle région a été nommée AUD37 (figure 17).

Figure 17 :

Carte schématique physique du chromosome de *S. ambofaciens* ATCC23877 (de 8 Mb environ). Les fragments de restriction *AseI* et leur taille (en kb) sont représentés. La région instable qui fait environ 2 Mb (un quart du génome) est représentée par un trait gris. Les TIR (flèches grises), les protéines terminales et la localisation des trois régions amplifiables caractérisées chez *S. ambofaciens*, dont la région AUD37 mise en évidence dans ce travail, sont indiqués.



1.3.2.2. Stabilité de l'amplification

Les amplifications décrites chez des mutants de *S. ambofaciens* sont connues pour être instables et fréquemment perdues dans la descendance de tels mutants. Par exemple, pour le mutant NSA205, portant une amplification dans l'AUD90, près de 10 % des colonies avaient perdu cette amplification (Dary *et al.*, 1992). La fréquence de perte de l'amplification de 29C1 a donc été recherchée. Sur 1262 colonies de 29C1 étalées sur milieu HT et observées après 14 jours de croissance, 248 ne produisaient plus le pigment vert caractéristique de cette souche. Ces colonies étaient blanches comme la souche mutante *pap1* de laquelle dérive 29C1. Dix-huit colonies blanches et 17 vertes ont été sélectionnées et sous-clonées. De chacune de ces souches, l'ADN génomique a été extrait et digéré par *Bam*HI. Les 17 souches produisant une pigmentation verte présentaient un profil *Bam*HI typique de la souche 29C1 alors que les 18 souches dépigmentées avaient perdu l'amplification. Ainsi, il existerait une relation entre le phénotype pigmenté vert et la structure chromosomique caractéristique de la souche 29C1. De plus, cette structure apparaît être instable avec un pourcentage d'instabilité de l'ordre de 20 %.

1.3.3. Le chromosome de 29C1 est délété

Associée à cette amplification, des délétions ont été détectées grâce notamment à l'analyse de profils de macrorestriction obtenus par électrophorèse en champs pulsés. Différentes conditions de migration en PFGE ont été utilisées dans le but de distinguer les fragments de différentes tailles et afin de préciser ainsi les profils de macrorestriction obtenus (figure 3 de l'article n°1). Etant donné que la souche 29C1 porte le plasmide recombinant 29C1, intégré au niveau du site chromosomique *attB* et qui porte un site de restriction *AseI* (figure 14), le fragment de 1100 kb (C'') dans lequel se situe le site *attB* disparaît et deux nouveaux fragments, d'environ 880 kb (*1) et 230 kb (*2) sont détectés. Par ailleurs, les fragments de restriction *AseI* de 820 kb (D''), 440 kb (G''), 600 kb (E'') et 310 kb (I'') sont absents sur un profil de macrorestriction *AseI* de la souche 29C1, ce qui suggère qu'ils sont au moins partiellement délétés (figure 18 et figure 3 de l'article n°1). Ainsi, associé à l'amplification, la souche 29C1 présente de grandes délétions situées aux extrémités du chromosome.

1.3.4. Le chromosome de 29C1 serait circulaire

Afin de préciser la structure chromosomique de la souche 29C1, des analyses complémentaires par hybridation sur profil de restriction *AseI* ou *BamHI* de cosmides révélant des régions situées aux extrémités du chromosome ont été réalisées. Le nom des cosmides utilisés ainsi que la région révélée par ces cosmides sur les extrémités du chromosome de *S. ambofaciens* sont indiqués dans la figure 18.

La région amplifiée n fois, révélée par le cosmide recombinant A68 et partiellement par celui nommé A34, ainsi que la région délétée sont représentées sur cette figure. L'hybridation entre chacun de ces cosmides sur un profil de restriction *BamHI* de l'ADN génomique des souches WT8, pap1 et 29C1 a été réalisée. Pour le cosmide A68, les fragments de restriction *BamHI* de 1,3 kb, 2,8 kb, 5,3 kb et 5,6 kb sont révélés pour les trois souches. Or, le fragment *BamHI* de 18 kb révélé chez la souche WT8 et le mutant pap1, ne l'est pas chez la souche 29C1 (figure 2 de l'article n°1). Pour le cosmide A34, les fragments de restriction *BamHI* de 1,3 kb et 5,6 kb sont révélés pour les trois souches. Or, le fragment *BamHI* de 19 kb révélé chez la souche WT8 et le mutant pap1, ne l'est pas chez la souche 29C1. Pour les deux

cosmides, un fragment estimé à 22 kb est révélé uniquement chez la souche 29C1 (figure 2 de l'article n°1). Ce fragment correspond à une partie des fragments *Bam*HI de 18 kb et 19 kb (x et y) et constitue le fragment de jonction amplifié et créé par la réitération en tandem de la région amplifiable (figure 18).

Les délétions se situent de part et d'autre de l'amplification et présentent une taille d'environ 600 kb dans le bras chromosomique gauche et d'environ 800 kb dans le bras chromosomique droit. Lorsque le cosmide A68 est hybridé sur un profil de macrorestriction *Ase*I de l'ADN génomique de la souche 29C1, un fragment de haut poids moléculaire (>2000 kb) est détecté. Ce nouveau fragment *Ase*I correspondrait en fait au fragment qui contient l'amplification et qui relie les deux fragments partiellement délétés de 600 kb (E'') et 820 kb (D''). La présence de ce fragment suggère fortement que l'ADN chromosomique de 29C1 est circulaire.

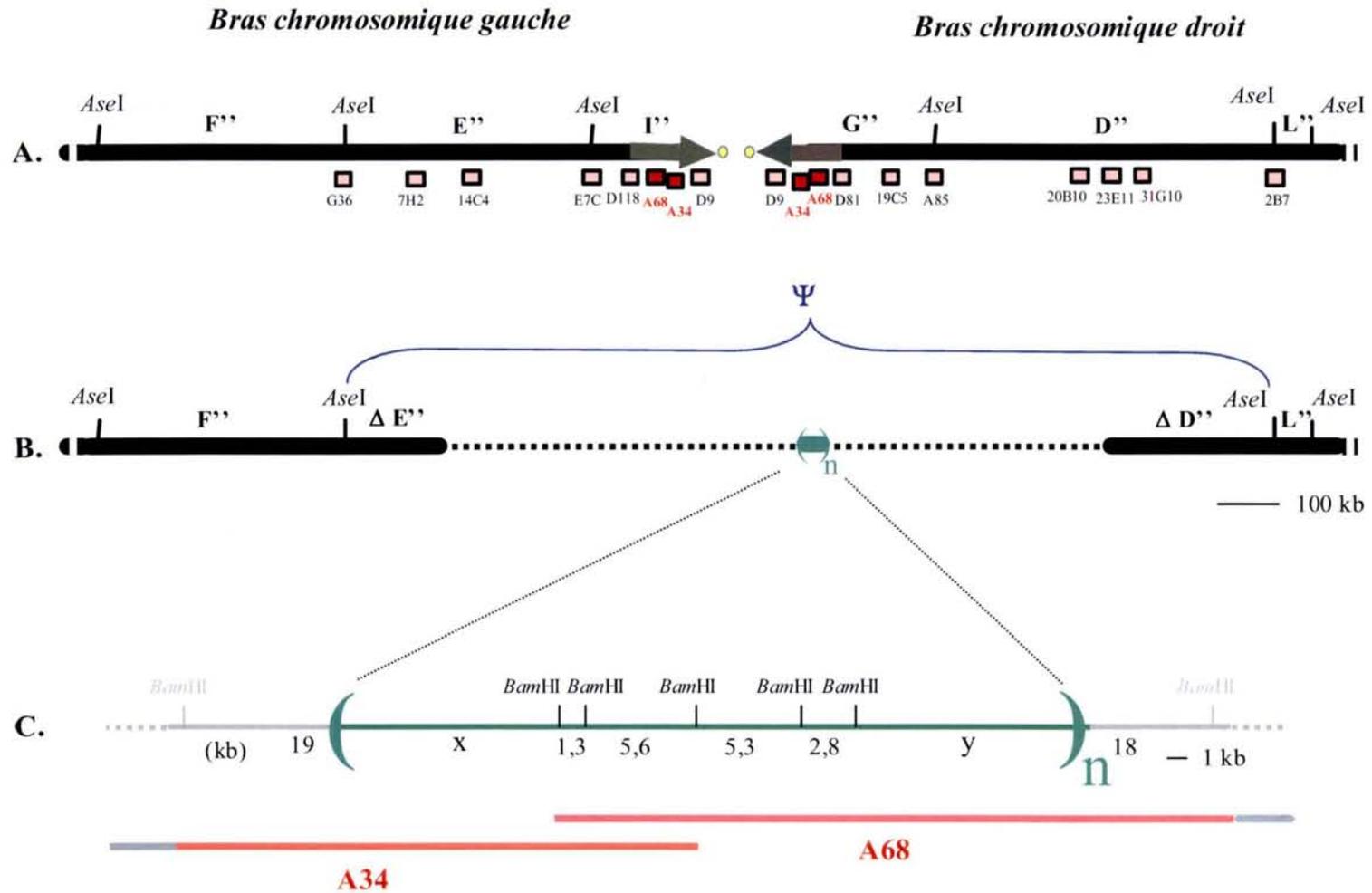


Figure 18 :

Cartes de restriction *AseI* des extrémités du chromosome des souches sauvage WT8 (A) et 29C1 (B) et *Bam*HI de l'AUD37 de 29C1 (C). A. Les rectangles rose et rouge indiquent la localisation des régions révélées par les cosmides (Fisher *et al.*, 1997) utilisés dans ce travail. Les cosmides A34 et A68 (rectangle rouge) correspondent aux cosmides amplifiés chez 29C1. Les séquences des TIR (flèches rayées jaune et noir) et les protéines terminales (en jaune) sont indiquées. B. La délétion des fragments G'', I'' et d'une partie de E'' (ΔE'') et D'' (ΔD'') est symbolisée par un trait en pointillé. La région amplifiée chez 29C1 est représentée en vert. Le nouveau fragment *AseI* généré chez 29C1 est symbolisé par Ψ. C. Taille des fragments de restriction *Bam*HI révélés par les cosmides A34 et A68 chez 29C1. Les valeurs x et y correspondent respectivement aux régions des fragments *Bam*HI de 19 kb et 18 kb qui constituent le fragment amplifié de 22 kb créé par la réitération en tandem de l'AUD37.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie de travail montre que la souche 29C1, en plus de son phénotype caractéristique et potentiellement intéressant au niveau biotechnologique, présente une structure chromosomique originale chez *Streptomyces*. Ces résultats ont fait l'objet de trois communications (deux affiches et une communication orale, voir annexes) et font l'objet de l'article suivant.

1.4. Article n°1

Article n°1

Spontaneous chromosome circularization and amplification of a new amplifiable unit of DNA belonging to the terminal inverted repeats in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877



ORIGINAL PAPER

Sibel Catakli · Axelle Andrieux · Pierre Leblond
Bernard Decaris · Annie Dary**Spontaneous chromosome circularization and amplification of a new amplifiable unit of DNA belonging to the terminal inverted repeats in *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877**Received: 9 October 2002 / Revised: 11 February 2003 / Accepted: 17 February 2003 / Published online: 3 April 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract In *Streptomyces*, the linear chromosomal DNA is highly unstable and undergoes large rearrangements usually at the extremities. These rearrangements consist of the deletion of several hundred kilobases, often associated with the amplification of an adjacent sequence, AUD (amplifiable unit of DNA). In *Streptomyces ambofaciens*, two amplifiable regions (AUD6 and AUD90), located approximately 600 kb and 1,200 kb from the right chromosomal end respectively, have been characterized. Here, the isolation and molecular characterization of a new *S. ambofaciens* mutant strain exhibiting a green-pigmented phenotype is described; the wild-type produces a gray pigment. In this mutant, both chromosome ends were deleted, which probably led to circularization of the chromosome. These deletions were associated with amplification of a sequence belonging to the chromosomal terminal inverted repeats (TIRs), which might constitute the new fragment generated by the chromosomal circularization.

Keywords *Streptomyces* · Genetic instability · Chromosome circularization · DNA amplification

Introduction

Streptomyces represent a large group of gram-positive soil-dwelling bacteria with a high G+C content. They undergo a complex cycle of morphological differentiation consisting of spore-bearing aerial hyphae on mycelial colonies (Chater 1998). During this process, these bacteria synthesize a wide range of antibiotics commonly used in veterinary and human therapy.

Streptomyces exhibit a high degree of genetic instability, which frequently affects secondary metabolism and results in the generation of mutants in which several hundred kilobases are deleted. In some cases, these deletions are associated with the amplification of an adjacent DNA sequence called AUD (amplifiable unit of DNA). This reiteration leads to the formation of the amplified DNA sequence (ADS; Fishman and Hershberger 1983; Leblond and Decaris 1999). Although ADSs are usually associated with a deletion, they were not detected in a few cases, particularly regarding amplifications located in the center of the *Streptomyces coelicolor* chromosome (Redenbach et al., 2000). Hütter and Eckard (1988) proposed to distinguish two types of AUDs on the basis of their structure. In the first type, AUDs often occur in the same chromosomal region, but differ in size. In the second type, the AUD corresponds to a sequence that is flanked by two long direct-repeated sequences (larger than 1 kb) that appear to be required for the amplification process. This latter type of AUD is reproducibly amplified in independent isolates and its amplification seems to be RecA-dependent (Hütter and Eckhardt 1988; Volff and Altenbuchner 2000). Although some amplifications have been selected on the basis of increased resistance or overproduction of a particular product, the majority seem to take place in the absence of any particular selective pressure (Schmid et al. 1999).

Most genome rearrangements are located at the extremities of the chromosomal DNA, which is a linear molecule of about 8 Mb in length ending with terminal inverted repeats (TIRs) covalently bound to proteins. Such proteins appear to be absolutely necessary for the replication of the linear chromosomal DNA (Bao and Cohen 2001). The *Streptomyces* chromosomal DNA can also exist in a circular form. Artificial circularization of the *Streptomyces lividans* chromosome leads to a viable, but highly unstable mutant. Furthermore, genetic instability generates mutants with a circular chromosome that can be amplified or not (Rauland et al. 1995; Lin and Chen 1997; Volff et al. 1997).

In *Streptomyces ambofaciens*, the gray pigmentation of the colony is affected by genetic instability, which leads to

S. Catakli · A. Andrieux · P. Leblond · B. Decaris · A. Dary (✉)
Laboratoire de Génétique et Microbiologie
(UMR INRA/UHP 1128), IFR 110,
Faculté des Sciences de l'université Henri Poincaré-Nancy 1,
BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Tel.: +33-3-83684209, Fax: +33-3-83684499,
e-mail: dary@scbiol.u-nancy.fr

colonies harboring one or several sectors and/or white papillae and pigment-defective colonies. Mutants deriving from papillae ($\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ mutants) are devoid of any detectable deletion and/or DNA amplifications usually observed in mutants isolated either from sectors or pigment-defective colonies (Martin et al. 1998, 1999). Characterization of several amplifications has revealed that they mainly occur in two regions, AUD6 and AUD90, located outside of the TIRs at about 600 kb and 1,200 kb, respectively, from the right chromosomal end (Demuyter et al. 1988; Leblond et al. 1989, 1996). About 75% of amplification events affect one of these loci in *S. ambofaciens* ATCC 23877 (Martin et al. 1999). The *S. ambofaciens* amplified mutants described to date have lost one extremity but have conserved a linear structure (Fischer et al. 1997).

In order to elucidate the molecular modification behind the white phenotype of one $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ mutant (WT8p25), a genomic library of a wild-type subclone was constructed and screened for its capacity to restore the wild-type phenotype in the mutant WT8p25. Here we describe the isolation and characterization of strain 29C1, which produces a green pigment. Its chromosome contained a DNA amplification resulting from the tandem reiteration of a sequence belonging to the TIRs. Such an amplification has never been observed before in *S. ambofaciens*. Elucidation of the chromosomal structure of this strain revealed that both extremities had been deleted and a new fragment generated. It contained the ADS and probably resulted from circularization of the chromosome. Finally, while *Streptomyces* amplifications are generally associated with one deletion event, this new ADS was associated with two deletion events since the sequences located on both sides of this ADS were deleted.

Materials and methods

Bacterial strains, antibiotics and culture conditions

Three *S. ambofaciens* strains (WT8, WT8p25 and 29C1) were used in this work. Strain WT8 is a wild-type subclone of *S. ambofaciens* ATCC 23877, whose genetic instability has been detailed in previous works (Martin et al. 1998, 1999). Strain WT8p25 is a $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ mutant derived from a white papillae of a pigmented colony of strain WT8. Strain 29C1 is derived from strain WT8p25 and is described in this work. The plasmid pUB307 was used for the mobilization of pSET152 derivatives from *Escherichia coli* to *Streptomyces*. *E. coli* MRF307 was constructed by introducing pUB307 by conjugation from the donor *E. coli* ET12567 (Flett et al. 1997) to the recipient *E. coli* XL1MRF/Blue (Stratagene). Donor and recipient strains were grown at 37 °C with agitation (250 rpm) up to exponential phase and mixed in a ratio of one donor cell to five recipient cells. After 90 min of incubation at 37 °C without agitation, exconjugants were selected on LB solid medium supplemented with tetracycline, kanamycin (both from Sigma) and nalidixic acid (Roche Molecular Biochemicals).

Streptomyces strains were grown either in Hickey-Tresner (HT) liquid or solid medium (Pridham et al. 1956–1957) or in TSB liquid medium for conjugation experiments. For DNA extraction, *Streptomyces* strains were usually grown in HT or YEME liquid medium (Hopwood et al. 1985). *E. coli* strains were incubated in LB medium (Sambrook et al. 1989) supplemented or not with antibiotics. Conjugation between *E. coli* and *S. ambofaciens* was done on AS-1 medium (Baltz 1980). Ampicillin, apramycin (both from

Sigma), kanamycin, and tetracycline were used at a final concentration of 30 µg/ml in the different media. Nalidixic acid was used at a final concentration of 50 µg/ml.

S. ambofaciens WT8 genomic library construction, screening and conjugation conditions

A *Bam*HI partial digest of total DNA of strain WT8 was ligated with the plasmid pSET152 linearized with the same enzyme. pSET152 can be transferred from *E. coli* to *Streptomyces*, contains the apramycin resistance gene, and is integrated at the bacteriophage Φ C31 *attB* chromosomal site in *Streptomyces* (Bierman et al. 1992). After transformation of *E. coli* MRF307 under standard conditions (Dower et al. 1988), transformants were selected on LB solid medium supplemented with tetracycline, kanamycin, apramycin, X-gal (80 µg/ml) and IPTG (48 µg/ml). To try to complement the mutant phenotype of strain WT8p25, recombinant pSET152 plasmids were introduced into this mutant by conjugation using a mixture of ten *E. coli* recombinants as donors under conditions described previously (Mazodier et al., 1989). The *S. ambofaciens* exconjugants were selected by adding apramycin and ampicillin and observed after 1 week of incubation at 30 °C.

Integration can be checked by two alternative methods. The first consists of checking the integration of pSET152 on an *Ase*I profile. As pSET152 contains an *Ase*I site, its integration at the Φ C31 *attB* site, which is located on the C'' *Ase*I fragment of 1,100 kb, generates two new *Ase*I fragments of 880 and 230 kb. The second method consists of using pSET152 as a probe in hybridizations on *Pst*I-digested total DNA of each *S. ambofaciens* exconjugant. Two fragments of 5.4 and 2.4 kb are usually detected when a plasmid without an insert is integrated, whereas the 2.4-kb *Pst*I fragment is absent and a new fragment is detected when pSET152 contains an insert.

Sporulation assay

To determine the capacity of a strain to sporulate, colony fragments constituted by mycelium and putative spores were stained using the Gram reaction and observed by light microscopy (Martin et al. 1998).

DNA extraction, restriction fragments and Southern analyses

S. ambofaciens total DNA was extracted from cultures grown overnight at 30 °C in HT liquid medium (Fischer et al. 1997). Restriction enzymes were used under the conditions recommended by the suppliers (New England Biolabs or Roche Molecular Biochemicals). DNA fragments were separated on agarose gels according to the method of Sambrook et al. (1989). Southern blotting, prehybridization and hybridization were done as previously described (Demuyter et al. 1988). Probes were labeled and specific hybrids detected using the DIG-DNA labeling and detection kit, following the conditions of the supplier (Roche Molecular Biochemicals). Probes used for molecular characterization of strain 29C1 were derived from a *S. ambofaciens* DSM40697 genomic library constructed in *E. coli* using the cosmid supercos 1 as vector (Leblond et al. 1996; Fischer et al. 1997). The chromosomal regions of *S. ambofaciens* DSM 40697 and ATCC 23877 revealed by these probes were determined in previous works (Fischer et al. 1997; Martin et al. 1999). It should be noted that supercos 1 and pSET152 cross-hybridize to each other under the conditions used in this study.

Pulsed-field gel electrophoresis

DNA was prepared from *S. ambofaciens* strains grown at 30 °C with agitation (200 rpm) in YEME liquid medium for 40 h as previously described (Leblond et al. 1996). Pulsed-field gel electro-

Fig. 1 Typical phenotype of *Streptomyces ambofaciens* WT8 (a), strain WT8p25 (b) and strain 29C1 (c) after 14 days of growth at 30 °C on HT medium. Under these growth conditions, most of the pigmented colonies exhibited white papillae in the *S. ambofaciens* ATCC 23877 wild-type subclones (Martin et al. 1998)

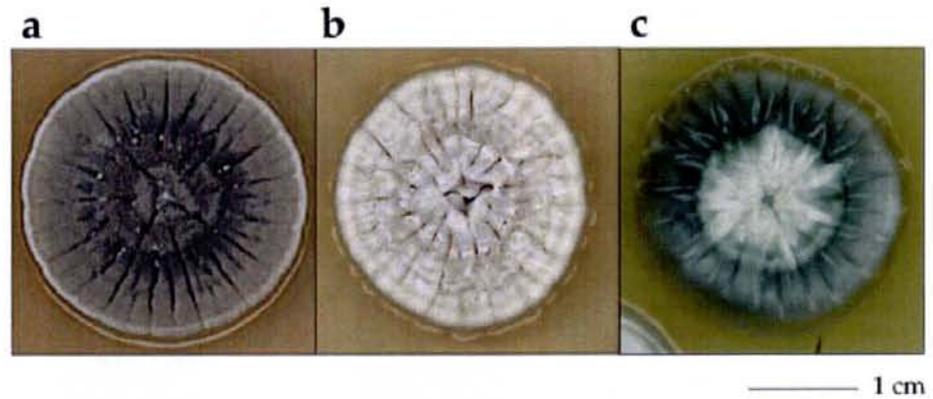
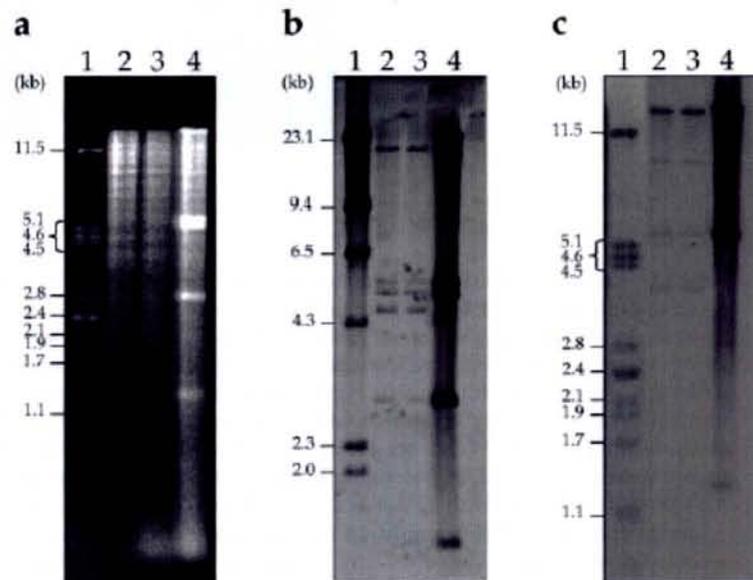


Fig. 2 *Bam*HI restriction patterns (a) of *S. ambofaciens* WT8 (lane 2), strain WT8p25 (lane 3) and strain 29C1 (lane 4) hybridized with probes A68 (b) and A34 (c), which revealed sequences belonging to the chromosomal TIRs. λ DNA digested with *Pst*I (a, c) or with *Hind*III (b) was used as molecular mass marker



phoresis (PFGE) runs were carried out in a CHEF system (Biorad, USA). In all experiments, 0.9% or 1% agarose gels were run in a 0.5xTBE electrophoresis buffer (Sambrook et al. 1989). Pulse times varied according to the size of the DNA fragments being separated. DNA of *S. ambofaciens* ATCC 23877 restricted with *Ase*I consists of 14 fragments (see Results) with sizes of 1,650 kb (A'' and B''), 1,100kb (C''), 820kb (D''), 600kb (E'' and F''), 440 kb (G''), 330 kb (H''), 310 kb (I''), 280kb (J''), 260kb (K''), 105 kb (L''), 50 kb (M'') and 40 kb (N'') (Leblond et al. 1996).

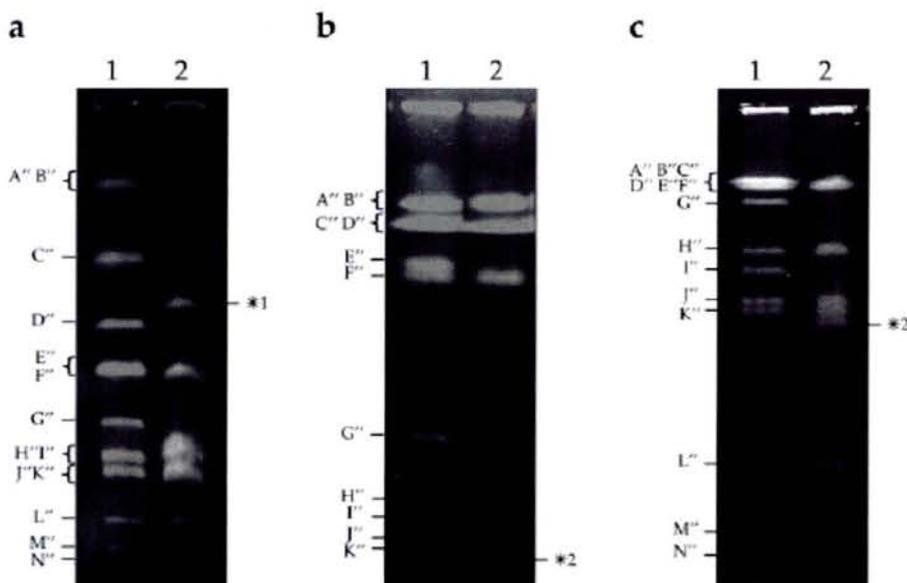
Results

Isolation of a green-pigmented *S. ambofaciens* 29C1 mutant

During the screening of a genomic library of the wild-type strain WT8 that was constructed using pSET152 (see Materials and methods) to complement the pigment-synthesis and spore-formation deficiencies of one Pig_{pap} mutant (WT8p25), one strain exhibiting a green pigmentation was isolated (Fig. 1). This green pigmentation might be an

intermediate of the gray pigment biosynthesis pathway or belong to another pigment synthesis pathway. Therefore this clone, 29C1, was subsequently subcloned and further characterized. Like the original strain WT8p25, strain 29C1 was not able to form spores. Hybridization of pSET152 against *S. ambofaciens* 29C1 DNA digested with *Pst*I revealed that the mutant possessed a recombinant plasmid with a 1.6-kb insert (see Materials and methods). This recombinant plasmid was subsequently identified and re-introduced by conjugation into strain WT8p25. More than 100 *S. ambofaciens* WT8p25 exconjugants were obtained, but none of them was able to synthesize the green pigment, which suggested that introduction of the recombinant plasmid of strain 29C1 was not sufficient to explain its characteristic phenotype.

Fig. 3 *AseI* restriction patterns of *S. ambofaciens* WT8 (lane 1) and strain 29C1 (lane 2) obtained under different pulsed-field electrophoresis conditions. Electrophoresis was carried out through a 1% (a, c) or 0.9% (b) agarose gel at 6 V per cm for 24 h (a), 36 h (b) or 31 h (c). Pulse time was 40–160 s (a), 40–50 s (b) or 40–160 s (c). The *1 and *2 fragments result from integration of strain 29C1 at the Φ C31 bacteriophage *attB* site (see Materials and methods)



S. ambofaciens 29C1 harbors a large genome rearrangement

An ADS of about 37 kb (Fig. 2a) and without any similarity to the different amplified patterns usually observed in *S. ambofaciens* (Demuyter et al. 1988; Leblond et al. 1989; Martin et al. 1999) was detected in total DNA of strain 29C1 digested with *Bam*HI. Furthermore, the ADS was not detected after hybridization with the recombinant cosmids 23E11 and 2B7 (data not shown), which are commonly used to reveal ADSs belonging to the AUD90 and AUD6 regions, respectively (Fischer et al. 1997).

As *Streptomyces* DNA amplifications are very often associated with a large deletion, *AseI* restriction patterns of *S. ambofaciens* strains WT8, WT8p25 and 29C1 were determined and compared using PFGE. No difference was observed between strains WT8 and WT8p25, confirming the absence of any large DNA rearrangement in mutant strain WT8p25 (data not shown). However, the *AseI* restriction pattern of strain 29C1 was different. Firstly, the C'' *AseI* fragment was absent and two new fragments (*1 and *2) were detected (Fig. 3), confirming the presence of a pSET152 derivative in the 29C1 mutant (see Materials and methods). Secondly, the D'', G'' (Fig. 3a), E'' and I'' (Fig. 3b, c) fragments were absent, which suggested that they were at least partially deleted.

Thus, mutant strain 29C1 harbored an ADS associated with a large deletion affecting both chromosomal extremities since the G'' and the I'' *AseI* fragments, which contain the TIRs (Leblond et al. 1996), were not observed.

S. ambofaciens 29C1 ADS belongs to the chromosomal TIRs

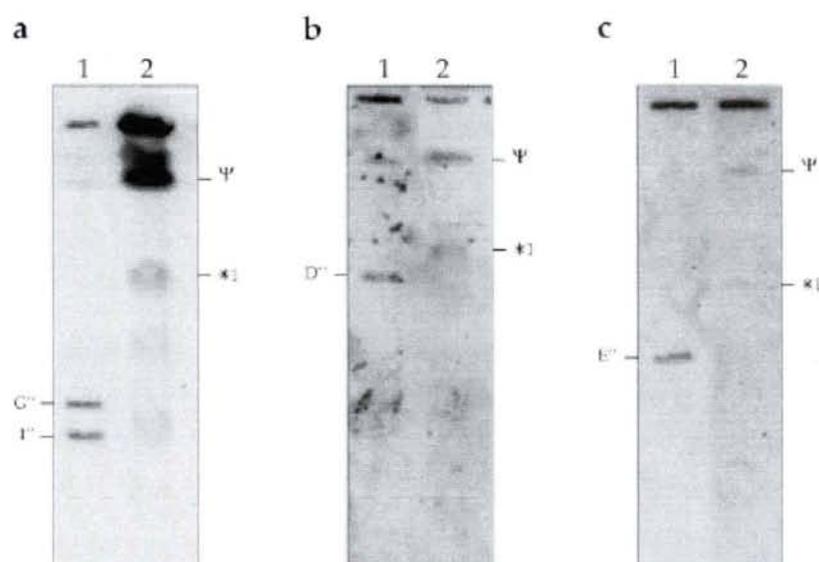
To confirm that both chromosomal extremities were deleted, recombinant cosmids used to reveal sequences of the D'',

E'', G'' and I'' *AseI* fragments were hybridized against DNA of strain 29C1 digested with *Bam*HI. Three groups of probes were used in these experiments (Fig. 4a). The first included the probes G36, 7H2, 14C4, and E7C, which reveal sequences of the F'', E'' and I'' *AseI* fragments from the left chromosomal arm. The second contained the probes 2B7, 31G10, 23E11, 20B10, A85 and 19C5, which reveal sequences of the L'', D'' and G'' *AseI* fragments from the right chromosomal arm. The third group corresponded to probes D9, 12A10, A31, A34, A68, D81, and D118, which are homologous to the chromosomal TIRs.

A typical wild-type hybridization profile was observed with probes G36, 7H2, 31G10 and 2B7, showing that the corresponding regions were not deleted in mutant strain 29C1 (Fig. 4b). The region revealed with probe 23E11 was partially deleted in the mutant since only some *Bam*HI fragments present in the wild-type profile remained in that of strain 29C1. No new *Bam*HI fragment was detected (data not shown). Therefore, one deletion endpoint was located in the 23E11 region. No hybridization signal was detected after hybridization of probes E7C, 14C4, 19C5, A85 and 20B10 to DNA of strain 29C1. Therefore, the corresponding regions located either on the left or on the right chromosomal arm were deleted. Finally, no hybridization signal was observed with probes that reveal chromosomal TIRs, except with probes A68 and A34. In conclusion, chromosomal TIRs of mutant strain 29C1 were not entirely deleted.

All the *S. ambofaciens* 29C1 amplified *Bam*HI fragments (22, 5.6, 5.3, 2.8 and 1.3 kb) were seen after probing with A68 (Fig. 2b) and only three of them (22, 5.6 and 1.3 kb) after probing with A34 (Fig. 2c). Thus, the ADS of strain 29C1 was derived from the reiteration of a new AUD located in the TIRs. As shown in Fig. 4c, the A34 and A68 regions share two *Bam*HI fragments of 5.6 and 1.3 kb. The *Bam*HI maps of the A68 and the A34 regions, established in earlier works (Fischer et al. 1997), were

Fig. 5 Hybridization between the *AseI*-restricted DNA of *S. ambofaciens* WT8 (lane 1) and strain 29C1 (lane 2) with probes A68 (a), 23E11 (b) and 7H2 (c). Pulsed-field electrophoresis through a 0.9% agarose gel was carried out at 6 V per cm for 24 h. Pulse time was 40–160 s. Ψ designates the high-molecular-weight fragment specifically revealed in strain 29C1 by the three probes. The G'' and I'' fragments are normally revealed by probe A68 in the wild-type, whereas the D'' and the E'' fragments are revealed by probes 23E11 and 7H2, respectively. The *1 fragment was revealed because of cross-hybridization between supercos 1 and pSET152 (see Materials and methods)



Stability of amplification of strain 29C1

Amplified mutants are known to be unstable, and the amplified regions are frequently lost in the progeny of such mutants. For example, in the mutant *S. ambofaciens* NSA205, about 10% of the descendants have lost the amplification (Dary et al. 1992). Hence, the stability of the amplified region of strain 29C1 was investigated. The rate of phenotypic instability in the progeny of this mutant was determined; about 19% (248/1262) of the colonies lost the typical green pigmentation and became white, like the ancestor strain WT8p25. Eighteen white colonies and 17 green colonies were randomly selected, subcloned and the *Bam*HI restriction patterns were determined. All of the mutants forming white colonies and none of the strains forming green colonies lost the amplified region (data not shown). These results suggest a correlation between the green phenotype and the typical chromosomal structure of strain 29C1, and allowed the conclusion that the 29C1 chromosomal structure was unstable.

Discussion

The amplified structure of *S. ambofaciens* 29C1 displays specific features. First, the sequences located on both sides of the amplified region have been deleted and the resulting mutant chromosome of strain 29C1 appears to be circular. By contrast, the spontaneous amplified mutants of *S. ambofaciens* characterized previously have a linear chromosomal DNA (Fischer et al., 1997) and harbor an amplified region associated with a deletion located only on one side of the ADS. Second, most of the amplifications characterized in *S. ambofaciens* result from the reiteration of AUDs situated several hundred kilobases from the chromosomal ends (Demuyter et al. 1988, 1991; Dary et al. 1992), whereas the ADS of strain 29C1 derived from a reiteration of an AUD located in the chromosomal TIRs.

Finally, the situation observed in strain 29C1, in which the ADS was associated with two deletion events, has been previously observed only in an *S. lividans* mutant with an artificially circularized chromosome. In this latter case, the plasmid used for circularization was amplified, and this event was associated with deletion of flanking sequences of the plasmid integration site (Lin and Chen 1997; Volff et al. 1997).

To explain the fact that amplification is usually associated with one deletion, Young and Cullum (1987) proposed that amplification might result from entrapment of a replication fork in a circular structure resulting from a recombination event. The resolution of such a structure by a recombination event downstream of the site of the original recombination event might lead to an amplification associated with a deletion. The situation observed on the amplified circular chromosomes might be explained by two alternative hypotheses. The first is that the amplification on a circular chromosome is not processed in the same manner as that on a linear chromosome. The second is that the amplification process on a linear or circular chromosome is similar, but in the latter case, depending on its location, the amplification could induce some structural constraints that might be resolved by the selection of a second deletion event as a compensatory mutation.

Acknowledgements Many thanks are given to Paul Sumbly for his help in the English formulation of the manuscript. This work was supported by "le Ministère de la Jeunesse de l'Éducation Nationale et de la Recherche".

References

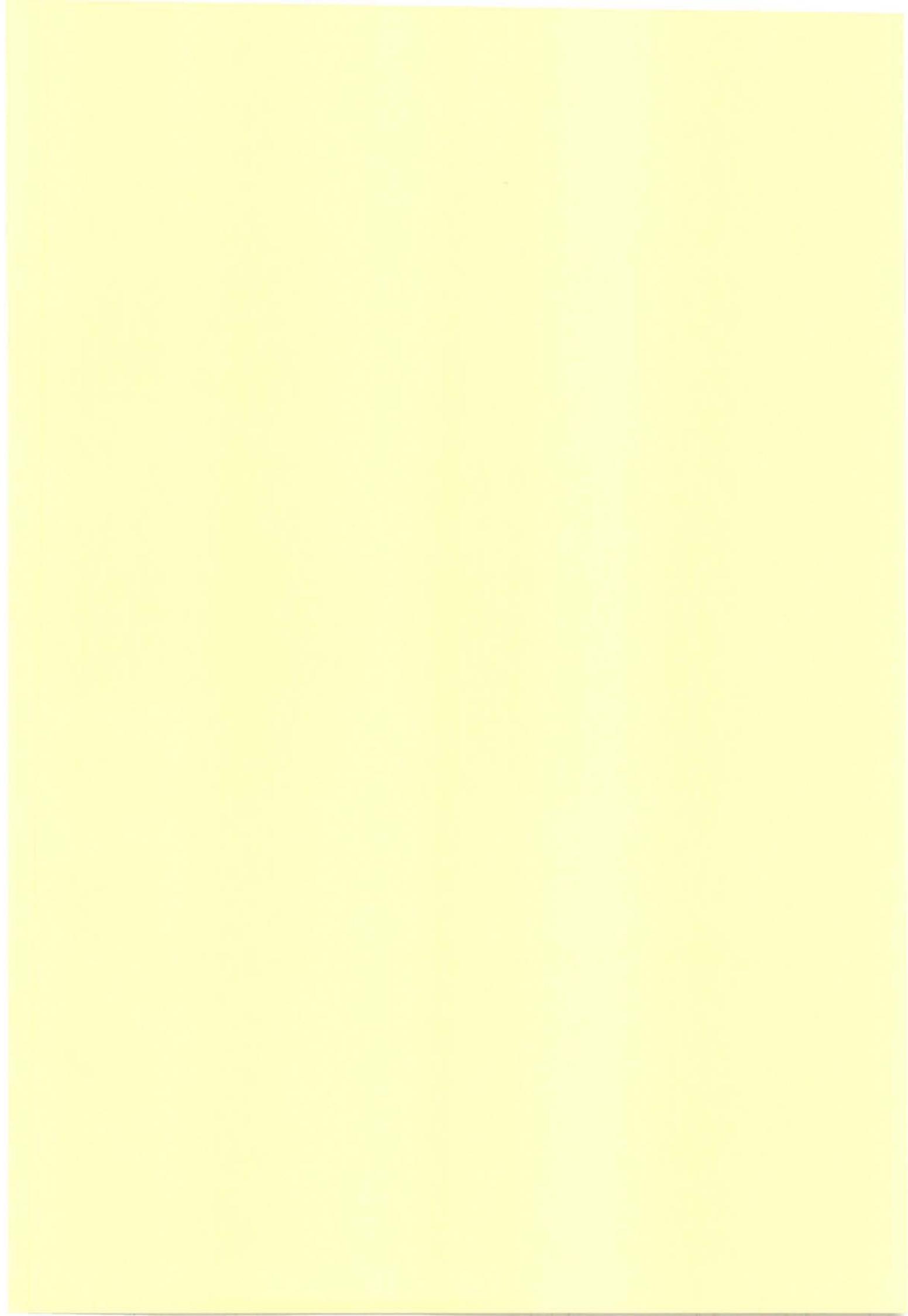
- Baltz RH (1980) Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*. *Dev Ind Microbiol* 21:43–54
- Bao K, Cohen SN (2001) Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev* 15:1518–1527

- Bierman R, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Nagaraja Rao R, Schoner BE (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116:43-49
- Chater KF (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 144:1465-1478
- Dary A, Bourget N, Girard N, Simonet J-M, Decaris B (1992) Amplification of a particular sequence in *Streptomyces ambofaciens* RP181110 reversibly prevents spiramycin production. *Res Microb* 143:99-112
- Demuyter P, Leblond P, Decaris B, Simonet JM (1988) Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J Gen Microbiol* 134: 2001-2007
- Demuyter P, Schneider D, Leblond P, Simonet J-M, Decaris B (1991) A chromosomal region as a hotspot for multiple rearrangements associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens* DSM40697. *J Gen Microbiol* 137:491-499
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-6145
- Fischer G, Decaris B, Leblond P (1997) Occurrence of deletions associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J Bacteriol* 179:4553-4558
- Fishman SE, Hershberger CL (1983) Amplified DNA in *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* 155:459-466
- Flett F, Mersinias V, Smith CP (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 155:223-229
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces* - a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich
- Hütter R, Eckhardt T (1988) Genetic manipulation. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic, London, pp 89-184
- Leblond P, Decaris B (1999) Unstable linear chromosomes: the case of *Streptomyces*. In: Charlebois RL (ed) *Organization of the prokaryotic genome*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp 235-261
- Leblond P, Demuyter P, Moutier L, Laakel M, Decaris B, Simonet JM (1989) Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol* 171:419-423
- Leblond P, Fischer G, Francou FX, Berger F, Guérineau M, Decaris B (1996) The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol Microbiol* 19: 261-271
- Lin YS, Chen CW (1997) Instability of artificially circularized chromosomes of *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* 26:709-719
- Martin P, Dary A, Decaris B (1998) Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium *Streptomyces ambofaciens*: characterization of different mutator states. *Mutat Research* 421:73-82
- Martin P, Dary A, André A, Fischer G, Leblond P, Decaris B (1999) Intracolonial polymorphism in the bacterium *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877: evidence for a high degree of heterogeneity of the wild type clones. *Mutat Res* 430:75-85
- Mazodier P, Petter R, Thompson C (1989) Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J Bacteriol* 171:3583-3585
- Pridham TG, Anderson P, Foly C, Lindenfelser LA, Hesseltine CW, Benedict RC (1956-1957) A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotic Ann:* 947-953
- Rauland U, Glocker I, Redenbach M, Cullum J (1995) DNA amplifications and deletions in *Streptomyces lividans* 66 and the loss of one end of the linear chromosome. *Mol Gen Genet* 246: 37-44
- Redenbach M, Kleinert E., Stoll A. (2000) Identification of DNA amplifications near the center of the *Streptomyces coelicolor* M145 chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 191:123-129
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Schmid E, Buchler C, Altenbuchner J (1999) AUD4, a new amplifiable element from *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 145: 3331-3341.
- Volff JN, Altenbuchner J (2000) The 1-kb-repeat-encoded DNA-binding protein as repressor of an α -glucosidase operon flanking the amplifiable sequence AUD1 of *Streptomyces lividans*. *Microbiology* 146:923-933.
- Volff J-N, Viell P, Altenbuchner J (1997) 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* 253: 753-760
- Young M, Cullum J (1987) A plausible mechanism for large-scale chromosomal DNA amplification in streptomycetes. *FEBS Lett* 212:10-14



2. Etude des mutants Pig-pap,
mutants produits au cours de la différenciation morphologique
chez *S. ambofaciens*





2. Etude des mutants Pig-pap, mutants produits au cours de la différenciation morphologique chez *S. ambofaciens*

Afin de déterminer la nature moléculaire des mutants Pig-pap, mutants produits à haute fréquence au cours de la différenciation du mycélium aérien chez *S. ambofaciens*, une approche par complémentation fonctionnelle du phénotype mutant, en introduisant des gènes connus chez *S. coelicolor* pour intervenir dans la sporulation et la pigmentation, dans des mutants Pig-pap, a été entreprise.

2.1. Les mutants Pig-pap sont des mutants *whi*

2.1.1. Isolement des mutants Pig-pap

Les trois mutants Pig-pap de *S. ambofaciens* analysés dans ce travail sont WT8p25 (renommé pap1), WT4p16 (renommé pap2) et WT12p28 (renommé pap3). Ces trois mutants proviennent de trois papilles dépigmentées dont le mycélium a été récupéré sur des colonies Pig⁺pap issues des sous-clones sauvages nommés respectivement WT8, WT4 et WT12. Plusieurs sous-clonages ont été réalisés dans le but d'obtenir une population avec un phénotype homogène, c'est-à-dire composée uniquement de colonies de phénotype mutant. Ces trois mutants sont donc issus d'événements mutationnels indépendants.

2.1.2. Taux de réversion du phénotype mutant Pig-pap vers le phénotype sauvage

Ces mutants présentent des colonies blanches avec un mycélium aérien abondant (figure 19).

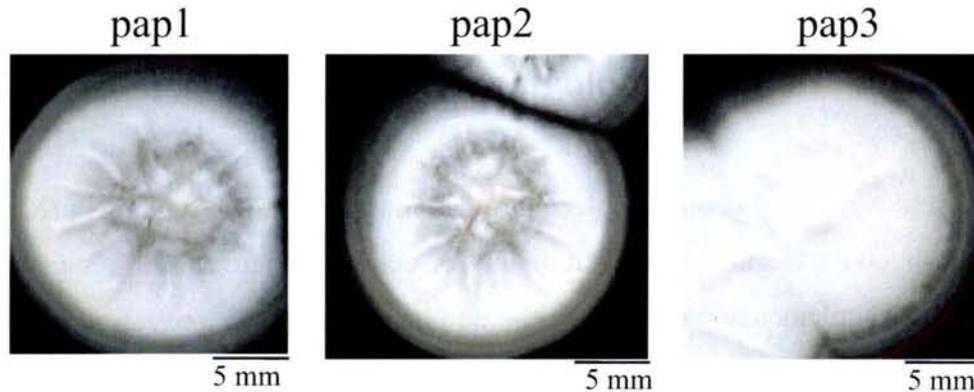


Figure 19 :
Photographies de colonies des trois mutants pap1, pap2 et pap3 cultivés 14 jours à 30°C sur milieu HT.

Par ailleurs, ce phénotype mutant apparaît être relativement stable. En effet, la descendance des trois mutants pap1, pap2 et pap3, a été étalée à raison d'environ 500 colonies par boîte sur milieu HT. Après sept jours de croissance à 30 °C, le taux de réversion vers le phénotype sauvage a été déterminé. Aucun révertant, c'est-à-dire aucune colonie pigmentée, n'a été observé sur environ 50000 colonies observées dans chaque descendance. Le taux de réversion ainsi estimé étant inférieur à 2.10^{-5} , le phénotype Pig-pap est relativement stable.

2.1.3. Les mutants Pig-pap ne sporulent pas

L'aptitude des mutants Pig-pap à sporuler a été déterminée dans un premier temps par observation de fragments de colonies, après coloration de Gram, au microscope photonique. Comme la très grande majorité des mutants Pig-pap testés préalablement (Martin *et al.*, 1999) (sur 49 mutants testés, un seul sporulait), les trois mutants Pig-pap analysés ne sporulaient pas.

2.1.4. Les mutants Pig-pap présentent un phénotype « *whiG-like* »

Chez *S. coelicolor*, des mutants déficients dans la sporulation ont été étudiés. Il s'agit des mutants *whi*. Chaque mutant caractérisé présente une conformation des hyphes aériens particulière et caractéristique de chacun qui correspond à un blocage à une étape spécifique au cours du processus de sporulation (voir introduction, figure 11). Certains mutants *whi* présentent des hyphes aériens droits tels les mutants *whiG* ou *whiH*, d'autres des

hyphes plus ou moins enroulés. Par ailleurs, certains mutants produisent des hyphes aériens qui commencent à se compartimenter et d'autres peuvent produire des spores dites aberrantes (Flårdh *et al.*, 1999). Le phénotype des hyphes aériens de quelques mutants *whi*, après observation en microscopie électronique à balayage, est représenté sur la figure 20. Les mutants *whiA* et *whiB* produisent des filaments aériens super-enroulés alors que ceux du mutant *whiI* le sont plus légèrement. Les hyphes aériens des mutants *whiG* et *whiH* sont droits. Des septations sont détectées sur les filaments aériens du mutant *whiH*.

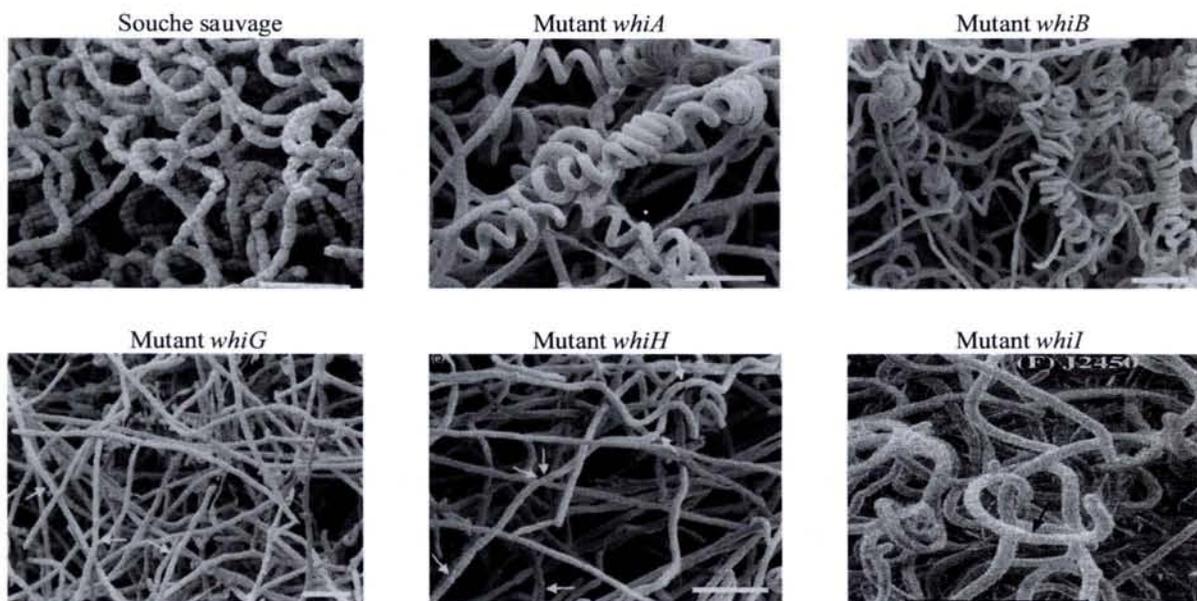


Figure 20 :

Photographies obtenues en microscopie électronique à balayage de la souche sauvage M145, des mutants *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiI* de *S. coelicolor* (d'après Flårdh *et al.*, 1999 et Ainsa *et al.*, 1999). Le trait dans chaque photo correspond à une taille de 10 µm.

Dans le but de préciser le phénotype des hyphes aériens produits par les trois mutants Pig-pap, des observations ont été réalisées en microscopie électronique à balayage, après 60 heures de croissance des différentes souches sur milieu HT. Les différents traitements ont été réalisés à l'unité de microscopie de la Faculté de médecine à Nancy par Luc Marshal. Les différentes observations réalisées sont présentées dans l'article n°2. Pour la souche sauvage, WT8, prise pour référence, des chaînettes de spores bien individualisées sont observées à 60 heures de croissance. Dans les mêmes conditions, les trois mutants Pig-pap ne sporulent pas et présentent des hyphes aériens droits sans septation apparente. Le phénotype mutant Pig-pap

est ainsi similaire au phénotype mutant *whiG* de *S. coelicolor*. Afin de confirmer cette similitude, la souche sauvage M145 et la souche mutante *whiG*, C71, de *S. coelicolor* ont également été observées dans les mêmes conditions de culture, de traitement et d'observation. Le phénotype observé pour chacune de ces deux souches est similaire à celui publié (Flardh *et al.*, 1999). Ainsi, dans la mesure où les filaments aériens produits par les mutants Pig-pap sont droits et ressemblent très fortement à ceux du mutant *whiG* de *S. coelicolor*, les mutants Pig-pap seraient bloqués dans les étapes précoces du processus de sporulation.

2.2. Etude du déterminisme génétique des mutants Pig-pap

2.2.1. Complémentation du phénotype mutant Pig-pap

2.2.1.1. Clonage des gènes *whi* dans le plasmide conjugatif et intégratif *pSET152*

Comme les mutants Pig-pap analysés ne sporulent pas et sont bloqués dans les premières étapes du processus de sporulation, nous avons cherché à compléter cette déficience par introduction de cinq gènes *whi* identifiés chez *S. coelicolor* et connus pour intervenir au début de la sporulation. Il s'agit de *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ*. Ces gènes, clonés dans le vecteur pIJ698 dont la carte physique et génétique est présentée dans la figure 21, nous ont été envoyés du centre John Innes à Norwich par Keith Chater. Chaque insert porteur d'un gène *whi* avait été cloné entre les deux sites *Bgl*II (1.70 et 6.29) (figure 21).

Ainsi, la taille des inserts est de :

- ❖ 7 kb pour le plasmide pIJ6204 (*whiA*) porteur du gène *whiA*,
- ❖ 6 kb pour pIJ2157 (*whiB*) porteur du gène *whiB*,
- ❖ 2,1 kb pour pIJ6301 (*whiG*) porteur du gène *whiG*,
- ❖ 5,1 kb pour pIJ6201 (*whiH*) porteur du gène *whiH* et
- ❖ 4 kb pour pIJ6205 (*whiJ*) porteur du gène *whiJ*.

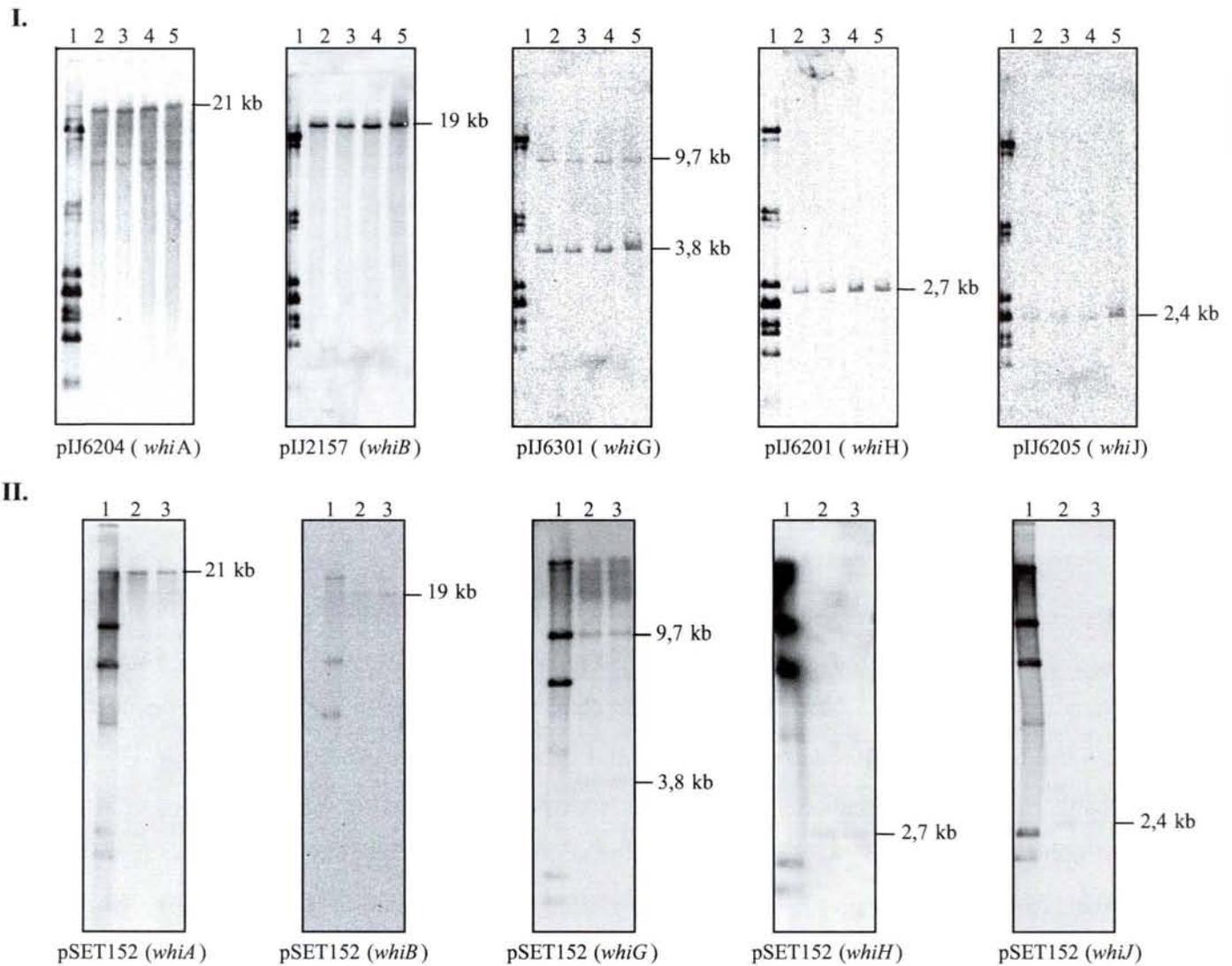


Figure 22 :

Profils d'hybridation permettant de révéler la présence de séquences homologues à cinq gènes *whi* de *S. coelicolor* (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ*) chez *S. ambofaciens*. **I.** Profils d'hybridation de pIJ6204 (*whiA*), pIJ2157 (*whiB*), pIJ6301 (*whiG*), pIJ6201 (*whiH*) et pIJ6205 (*whiJ*) sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 (piste 2), pap1 (piste 3), pap2 (piste 4) et pap3 (piste5). La piste 1 correspond au marqueur de taille, l'ADN du bactériophage λ digéré par *Pst*I. **II.** Profils d'hybridation de pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) et pSET152(*whiJ*) sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 (piste 2) et pap1 (piste 3). La piste 1 correspond au marqueur de taille, l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hind*III.

Les plasmides dérivés de pIJ698 peuvent se répliquer de façon autonome chez *Streptomyces*. Afin de compléter le phénotype mutant en *trans*, nous avons décidé de cloner chacun des cinq inserts porteurs d'un gène *whi*, dans le plasmide conjugatif et intégratif pSET152 (figure 14). Ce plasmide porte notamment un site de clonage *Xba*I. Chaque plasmide recombinant, pIJ6204 (*whiA*), pIJ2157 (*whiB*), pIJ6301 (*whiG*), pIJ6201 (*whiH*) et pIJ6205 (*whiJ*), a été digéré par cette enzyme, un site *Xba*I étant présent de part et d'autre de chaque insert (figure 21). Chaque insert, ainsi isolé, a été ligué dans le plasmide pSET152 linéarisé après digestion par *Xba*I. Les plasmides recombinants pSET152 porteurs de chaque insert ont été retenus après vérification des différents profils de restriction obtenus (notamment après digestion par *Xba*I). En outre, pour confirmer les différentes constructions, ces cinq plasmides ont été marqués et hybridés sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des souches WT8 et pap1. Ces plasmides révèlent les mêmes fragments *Bam*HI que précédemment (figure 22 II.). Ces cinq plasmides, pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) et pSET152(*whiJ*), ont donc été retenus pour les essais de complémentation fonctionnelle.

2.2.1.2. Complémentation des trois mutants *Pig-pap*

Les plasmides recombinants ont été introduits dans la souche donneuse *E. coli* MRF'307. Cette souche, résistante à la tétracycline et à la kanamycine, porte le plasmide pUB307 qui permet la mobilisation en *trans* de pSET152.

Le plasmide pSET152, utilisé comme témoin négatif, et les cinq plasmides pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) et pSET152(*whiJ*) ont ensuite été introduits dans les trois souches mutantes pap1, pap2 et pap3, suivant le protocole mis au point et décrit dans la première partie des résultats.

Le nombre de transconjugants obtenus et observés pour chaque conjugaison et le phénotype de chacun sont présentés dans le tableau 2 de l'article n°2. Un résumé et un exemple de phénotype observé sont illustrés dans la figure suivante.

× pap1, pap2 et pap3



+ pSET152
ou + pSET152(*whiA*)
ou + pSET152(*whiB*)
ou + pSET152(*whiH*)
ou + pSET152(*whiJ*)



- pas de pigmentation
- pas de sporulation

× pap1 et pap2



+ pSET152(*whiG*)



- pigmentation légèrement grise
- sporulation

× pap3



+ pSET152(*whiG*)



- pigmentation grise
- sporulation
- production de papilles

Figure 23 :

Phénotype des transconjugants observés après introduction des plasmides pSET152, pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*), pSET152(*whiJ*) dans les souches mutantes pap1, pap2 et pap3. Les observations et les photographies (dans cette figure sont représentées une photographie d'une colonie de pap1 pour les deux premiers cas, une photographie d'une colonie de pap3 pour le dernier cas et pour chaque cas une colonie des transconjugants obtenus) ont été réalisées après 14 jours de croissance des cultures sur milieu HT et le trait sous les photographies correspond à une longueur de 5 mm.

L'introduction du plasmide seul ou des plasmides recombinants pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiH*) ou pSET152(*whiJ*) dans les mutants pap1, pap2 et pap3 ne permet pas le retour à la pigmentation et à la sporulation. Par contre, lorsque le plasmide qui porte le gène *whiG* de *S. coelicolor* est transféré dans les souches mutantes Pig-pap, un retour à la pigmentation est détecté. Une différence de phénotype des transconjugants obtenus pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) et pap3(*whiG*) est constatée (figure 23). En effet, l'intensité de la pigmentation des colonies du transconjugant pap3(*whiG*) apparaît plus élevée que celle des deux autres transconjugants et semble similaire à celle d'une souche sauvage de *S. ambofaciens*. Pour pap1(*whiG*) et pap2(*whiG*), la pigmentation légèrement grise des colonies pourrait s'expliquer par une plus faible quantité soit de spores produites par ces souches soit de pigment produit par spore par rapport à la souche sauvage. L'introduction de pSET152(*whiG*) dans les trois souches mutantes complète la déficience de sporulation.

En effet, l'observation en microscopie électronique à balayage du mycélium aérien des trois transconjugants montre que les filaments aériens se différencient en chaînettes de spores (figure 1 de l'article n°2). Toutefois, les spores produites par les transconjugants pap1(*whiG*) et pap2(*whiG*) apparaissent moins bien arrondies que les spores produites par le transconjugant pap3(*whiG*) ou la souche sauvage WT8, ce qui suggère qu'elles sont moins bien différenciées. Ainsi, les mutants pap1, pap2 et pap3 semblent génétiquement différents. De plus, un retour à la production de papilles blanches sur les colonies du transconjugant pap3(*whiG*) est observé.

L'analyse moléculaire des différents transconjugants obtenus a été réalisée dans le but de vérifier la présence de chaque plasmide intégré d'une part au niveau du site *attB* du phage ϕ C31, par macrorestriction *AseI* après migration en PFGE, et d'autre part en une seule copie, par hybridation réalisée avec chaque plasmide marqué sur profil de restriction *BamHI* de l'ADN génomique de ces transconjugants. Ainsi, les résultats obtenus ont permis de révéler la présence de chaque plasmide intégré en copie unique dans le génome des transconjugants. Ce résultat indique, par ailleurs, que le phénotype du transconjugant pap3(*whiG*) n'est pas dû à la présence de copies surnuméraires de *whiG* dans son génome par intégration multiple du plasmide pSET152(*whiG*)

2.2.2. Le gène *whiG* est-il muté chez les mutants Pig-pap ?

Dans la mesure où le phénotype des trois mutants Pig-pap pouvait être complété par introduction d'un gène *whiG* de *S. coelicolor*, nous avons recherché la présence de mutations dans ce gène chez ces trois mutants.

La séquence du gène *whiG* de *S. ambofaciens* étant inconnue, des couples d'oligonucléotides ont été choisis à partir de la séquence disponible dans les banques de données du gène *whiG* de *S. coelicolor*. Le numéro d'accèsion de cette séquence est NC_003888. A partir des trois couples d'amorces G1/G2, G3/G4 et G5/G6 (voir tableau 1 et figure 2 de l'article n°2), le gène *whiG* a été séquencé chez la souche sauvage WT8 et les trois souches mutantes pap1, pap2 et pap3.

La séquence de *whiG* de la souche WT8 de *S. ambofaciens* est disponible dans la banque de donnée GeneBank sous le numéro d'accèsion AY_497380. En considérant que les séquences promotrice et terminatrice du gène *whiG* de *S. ambofaciens* sont similaires à celles identifiées et publiées chez *S. coelicolor* (Chater *et al.*, 1989), les séquences nucléotidiques du gène *whiG* de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont homologues (90,2 % d'identité). Par ailleurs, la séquence en acides aminés de WhiG de *S. ambofaciens* présente 98,4 % d'identité avec celle de *S. coelicolor* (Chater *et al.*, 1989), 95,4 % d'identité avec celle de *S. avermitilis* (Omura *et al.*, 2001), 91,4 % d'identité avec celle de *S. griseocarnum* (Soliveri *et al.*, 1993) et 91 % d'identité avec celle de *S. aureofaciens* (nommée RpoZ) (Kormanec *et al.*, 1994). De plus, les régions 2.4 et 4.2, connues pour être impliquées dans la reconnaissance des séquences promotrices -10 et -35 des gènes régulés par les facteurs σ , sont très conservées entre les différents homologues de WhiG et sont notamment à 100 % identiques entre les séquences de *S. ambofaciens*, *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* (figure 3 de l'article n°2). Ce résultat suggère très fortement que le facteur σ^{WhiG} de *S. ambofaciens* régule les mêmes gènes que le facteur σ^{WhiG} de *S. coelicolor* et σ^{RpoZ} de *S. aureofaciens* et notamment le gène *whiH* (Ainsa *et al.*, 1999; Kormanec *et al.*, 1999).

Par ailleurs, les alignements de séquences du gène *whiG* obtenues pour la souche WT8 et les trois souches mutantes pap1, pap2 et pap3 révèlent que ces séquences sont complètement identiques. Ainsi, les trois mutants Pig-pap dont la déficience en pigmentation et en sporulation est restaurée après introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor* ne présentent pas de mutation dans le gène *whiG*.

A ce stade, plusieurs hypothèses alternatives peuvent rendre compte de ce résultat. La mutation qui génère les mutants Pig-pap pourrait être :

- ❖ soit une modification affectant la transcription ou la traduction du gène *whiG*
- ❖ soit une modification affectant un régulateur de *whiG*.

Etant donné que chez *S. coelicolor* aucun régulateur de l'expression de *whiG* n'a encore été identifié, nous nous sommes focalisés sur la première hypothèse. Pour cela, une analyse transcriptionnelle du gène *whiG* chez les différentes souches de *S. ambofaciens* a été entreprise.

2.2.3. Le gène *whiG* est-il transcrit chez les mutants Pig-pap ?

2.2.3.1. Analyse transcriptionnelle de *whiG* par RT-PCR et suivi de la transcription de *whiG* au cours du temps

Pour cette analyse transcriptionnelle, la première étape du travail a été de mettre au point la technique d'extraction des ARN à partir de cultures obtenues sur milieu solide. Le protocole est décrit dans l'article n°2. Les ARN totaux ont été extraits d'une part à différents temps de croissance (14, 24, 48, 72 et 96 heures) pour la souche sauvage WT8 et la souche mutante pap1 et d'autre part à 48 heures de croissance pour les souches WT8, pap1, pap2 et pap3. Pour la souche sauvage *S. ambofaciens* WT8, à 48 heures de croissance sur milieu solide, le mycélium aérien est formé et le processus de sporulation déclenché. Cela suggère qu'à ce temps de culture la protéine WhiG est exprimée et fonctionnelle.

Puis, la transcription inverse des ARN totaux a été réalisée. Le protocole de cette méthode est également décrit dans l'article n°2. Elle comprend en fait trois étapes majeures :

- ❖ la fixation d'amorces aléatoires (des hexanucléotides) sur l'ARN
- ❖ un traitement à la DnaseI
- ❖ la transcription inverse

Pour chaque expérience, trois témoins de RT-PCR sont réalisés.

- ❖ Le témoin négatif de RT-PCR correspond au traitement d'eau par la DnaseI et la transcriptase inverse.
- ❖ Le deuxième témoin constitue un échantillon d'ARN qui n'est ni traité par la DnaseI ni par la transcriptase inverse. Il permet ainsi de mettre en évidence la présence d'ADN contaminant dans l'échantillon d'ARN.
- ❖ Le troisième témoin correspond à un aliquot de l'essai prélevé juste après le traitement à la DnaseI et qui n'est pas traité par la transcriptase inverse afin de vérifier l'efficacité de l'élimination de l'ADN contaminant par l'activité de la DnaseI.

Pour chaque expérience, l'essai est constitué d'un échantillon d'ARN (environ 3 µg d'ARN totaux) traité à la DnaseI et à la transcriptase inverse.

L'essai et les témoins ainsi réalisés sont soumis ensuite à une amplification par PCR. Les différentes étapes du protocole sont précisées dans l'article n°2. Deux µl d'ADNc générés par l'étape de transcription inverse sont amplifiés en utilisant des amorces spécifiques des séquences situées dans l'ORF dont la transcription est étudiée. Pour chaque expérience de PCR, deux témoins sont réalisés.

- ❖ Le témoin négatif de PCR correspond à une réaction d'amplification sur un volume d'eau afin de vérifier l'absence de contamination dans les réactifs.
- ❖ Le témoin positif correspond à l'amplification d'un échantillon d'ADN génomique des souches sauvages WT8 de *S. ambofaciens* ou M145 de *S. coelicolor* afin de tester si les oligonucléotides choisis amplifient bien une région spécifique du génome de ces souches.

Pour valider l'expérience de RT-PCR, un gène de référence a été choisi. Pour cette étude, le gène *recA* a été utilisé comme témoin interne. Il s'agit d'un gène codant une protéine majeure dans la recombinaison homologue et dans l'induction du système SOS. Ce gène est supposé être exprimé à toutes les phases de croissance. Des amorces ont été choisies dans la séquence de l'ORF de *recA* de *S. ambofaciens* et permettent l'amplification d'un produit de 280 pb chez cette espèce mais aussi chez *S. coelicolor* (tableau 1 de l'article n°2). Ainsi, si pour les témoins négatifs de RT-PCR, aucun produit spécifique au gène *recA* n'est détecté et si pour le témoin positif et pour l'essai réalisé avec l'échantillon d'ADNc, le produit attendu est observé, le lot d'ADNc généré après transcription inverse est utilisé pour tester l'expression d'autres gènes.

Ainsi, pour chaque souche testée et à chaque temps de croissance testé, les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés à l'aide des amorces G7/G8 permettant de révéler uniquement les transcrits spécifiques à *whiG* (tableau 1 de l'article n°2). Un transcrit *whiG* a été détecté aux cinq temps de croissance testés pour les souches WT8 et pap1 et à 48 h pour toutes les autres souches (figure 6 de l'article n°2). Ainsi, les trois mutants Pig-pap testés ne présenteraient pas une modification dans le gène *whiG* au niveau transcriptionnel.

2.2.3.2. Analyse transcriptionnelle de *whiG* par RT-PCR quantitative

Bien qu'un transcrit *whiG* ait été détecté dans les trois souches mutantes par RT-PCR, une approche par RT-PCR quantitative a été envisagée dans le but de quantifier ces transcrits et de comparer les différents niveaux de transcription pour la souche WT8 et les trois souches mutantes.

Le principe de la PCR quantitative en temps réel est basé sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent (dans cette étude, il s'agit du Sybr-Green) de la production d'amplicons durant chaque cycle d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Ainsi, grâce à un système de détection de la fluorescence, la courbe d'amplification de l'ADNc au cours du temps peut être tracée. Le seuil de détection de la fluorescence n'est atteint qu'après un certain nombre de cycles d'amplification. Le premier cycle de démarrage de la phase d'amplification correspond au cycle seuil (threshold cycle) définie par la valeur Ct. Ce nombre-seuil est fonction de la quantité de séquences d'ADNc cibles présentes dans la réaction de PCR. En fait, plus la valeur Ct est élevée, plus la quantité d'ADNc présents au départ pour la réaction de PCR est faible. Pour valider le Ct de chaque échantillon, la réaction est réalisée en dupliquât et la moyenne des deux valeurs de Ct est utilisée.

Dans cette étude, pour normaliser la quantité d'ADNc présents dans chaque échantillon (la souche sauvage ou les souches mutantes testées), le niveau de transcription de *whiG* est comparé à celui d'un gène de référence. Le gène *hrdB* a été choisi comme gène de référence. Chez *Streptomyces*, ce gène code un facteur σ qui régule de nombreux gènes du métabolisme basal (Shiina *et al.*, 1991). Il est supposé être transcrit à des niveaux similaires entre la souche sauvage et les souches mutantes. Pour l'analyse des résultats, le niveau d'ADNc de *whiG* dans la souche de référence, WT8, est toujours arbitrairement considéré égal à 1 et la quantité relative de transcrits *whiG* pour chaque souche mutante testée est comparée à celle de WT8. Pour calculer l'expression relative de *whiG* chez les mutants, plusieurs étapes de calculs sont réalisées. Pour chaque gène, le gène cible (*whiG*) ou le gène de référence (*hrdB*), la valeur Ct obtenue pour le mutant est soustraite à celle de WT8 pour obtenir les valeurs $\Delta\text{Ct } whiG$ et $\Delta\text{Ct } hrdB$. Ensuite, la valeur $\Delta\Delta\text{Ct}$ qui est la différence entre

le ΔC_t *whiG* et le ΔC_t *hrdB* est déterminée. Les changements de concentration en ARNm de *whiG* pour le mutant testé comparé à la souche sauvage correspondent à $2^{-\Delta C_t}$.

Plusieurs contraintes sont nécessaires à la réalisation d'une expérience de PCR quantitative. Les amorces doivent être choisies de façon à éviter leur dimérisation. De plus, pour pouvoir réaliser l'analyse de l'expression des deux gènes (*whiG* et *hrdB*) en parallèle, les températures de fusion (T_m) des deux couples d'amorces, le taux de bases en G et C et la taille de l'amplicon doivent être similaires. Par ailleurs, la spécificité de chaque couple d'oligonucléotides est déterminée grâce à la réalisation d'une courbe de fusion sur les produits de PCR obtenus. Un cycle de température qui correspond à une augmentation progressive de la température, de 55°C à 95°C, est donc réalisé et la fluorescence émise en fonction de la température est représentée sur un graphique. En réalisant la dérivée de cette fonction, un graphe sous forme de pics est obtenu où chaque pic correspond à un amplicon avec une température de fusion donnée. La spécificité est révélée par la présence d'un seul pic. De plus, l'efficacité de PCR pour le gène de référence (*hrdB*) et le gène cible (*whiG*) doit être comparable et doit être comprise entre 80 % et 100 %. Pour chaque gène, une courbe de calibration basée sur la valeur de C_t obtenue avec de l'ADN génomique de WT8 pour différentes dilutions (0, 1/210, 1/90, 1/30 et 1/10) est réalisée. Les amorces peuvent être utilisées si, pour les deux gènes, les courbes sont parallèles et présentent donc un coefficient de corrélation similaire. Pour cette étude, les deux couples d'oligonucléotides G9/G10 et HrdB1/HrdB2 respectent ces conditions.

La technique de RT-PCR quantitative a été utilisée dans le but de comparer le taux de transcrits *whiG* chez les mutants pap1, pap2 et pap3 par rapport à celui de la souche sauvage WT8. Par ailleurs, cette approche a également été utilisée pour estimer le niveau de transcrits *whiG* dans les transconjugants pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) et pap3(*whiG*) afin de vérifier si le transgène *whiG* est bien transcrit et n'est pas fortement surexprimé. Le tableau 3 récapitule les différentes valeurs de C_t obtenues pour chaque expérience et la moyenne de la quantité relative de *whiG* calculée pour chaque souche testée. Les résultats obtenus par cette technique sont également illustrés dans la figure 5 de l'article n°2.

	Ct <i>whiG</i>	Ct <i>hrdB</i>	Δ Ct <i>whiG</i>	Δ Ct <i>hrdB</i>	$\Delta\Delta$ Ct <i>whiG-hrdB</i>	Quantité relative
WT8	24,3	23	0	0	0	1
<i>pap1</i>	25,2	22,5	0,9	-0,5	1,4	0,38
WT8	22,3	21,2	0	0	0	1
<i>pap1</i>	22,4	20,15	0,1	-1,05	1,15	0,45
WT8	23,7	22,5	0	0	0	1
<i>pap1</i>	23,2	21,5	-0,5	-1	0,5	0,7
WT8	22,3	21,2	0	0	0	1
<i>pap1</i>	23,4	21	1,1	-0,2	1,3	0,4
WT8	23,7	22,5	0	0	0	1
<i>pap1</i>	24,5	22,5	0,8	0	0,8	0,57
WT8	20,05	21,75	0	0	0	1
<i>pap1</i>	21,6	23,05	1,55	1,3	0,25	0,84
WT8	21,25	23,05	0	0	0	1
<i>pap1</i>	22,9	24,65	1,65	1,6	0,05	0,97
WT8	19,3	20,5	0	0	0	1
<i>pap1</i>	21,85	22,05	2,55	1,55	1	0,5
WT8	22,2	22,42	0	0	0	1
<i>pap1</i>	22,4	21,8	0,2	-0,62	0,82	0,57
WT8	22,7	20,43	0	0	0	1
<i>pap2</i>	26,6	25	3,9	4,57	-0,67	1,6
WT8	22,1	22,45	0	0	0	1
<i>pap2</i>	21,9	21,8	-0,2	-0,65	0,45	0,73
WT8	23,45	23,5	0	0	0	1
<i>pap2</i>	22,04	21,7	-1,41	-1,8	0,39	0,76
WT8	21,25	23,05	0	0	0	1
<i>pap3</i>	21	23,07	-0,25	0,02	-0,27	1,2
WT8	22,1	22,4	0	0	0	1
<i>pap3</i>	20,5	19,75	-1,6	-2,65	1,05	0,48
WT8	23,15	23,45	0	0	0	1
<i>pap3</i>	21,45	19,72	-1,7	-3,73	2,03	0,24
WT8	25,7	22,49	0	0	0	1
<i>pap1(whiG)</i>	23,47	22,57	-2,23	0,08	-2,31	4,96
WT8	24,4	23	0	0	0	1
<i>pap1(whiG)</i>	23,3	23,1	-1,1	0,1	-1,2	2,3
WT8	22,1	22,42	0	0	0	1
<i>pap2(whiG)</i>	22,23	24,1	0,13	1,68	-1,55	2,93
WT8	21,66	21	0	0	0	1
<i>pap3(whiG)</i>	21,75	23	0,09	2	-1,91	3,76
WT8	24,22	21,41	0	0	0	1
<i>pap3(whiG)</i>	24,25	22,5	0,03	1,09	-1,06	2,08
WT8	21,66	21	0	0	0	1
<i>pap3 Gp2</i>	21,5	21,47	-0,16	0,47	-0,63	1,55
WT8	22,71	20,43	0	0	0	1
<i>pap3 Gp2</i>	20,85	17,8	-1,86	-2,63	0,77	0,59
WT8	24,22	21,4	0	0	0	1
<i>pap3 Gp2</i>	22,08	18,94	-2,14	-2,46	0,32	0,8
WT8	22,1	22,4	0	0	0	1
<i>pap3 Gp2</i>	20,63	20	-1,47	-2,4	0,93	0,52

Quantité relative moyenne
= **0,6**
($\sigma^{n-1}=0,2$)

Quantité relative moyenne
= **0,95**
($\sigma^{n-1}=0,5$)

Quantité relative moyenne
= **0,64**
($\sigma^{n-1}=0,5$)

Quantité relative moyenne
= **3,6**
($\sigma^{n-1}=1,8$)

Quantité relative moyenne
= **2,92**
($\sigma^{n-1}=1,19$)

Quantité relative moyenne
= **0,96**
($\sigma^{n-1}=0,5$)

Tableau 3 :

Récapitulatif des valeurs de Ct obtenues après RT-PCR quantitative avec le gène de référence (*hrdB*) et le gène cible (*whiG*) sur des extraits d'ADNc obtenus après cultures sur milieu solide à 48 heures des souches WT8, *pap1*, *pap2*, *pap3*, *pap1(whiG)*, *pap2(whiG)*, *pap3(whiG)* et *pap3Gp2*. Pour chaque expérience, la quantité relative de *whiG* pour la souche WT8 est mise arbitrairement à 1 et la quantité relative pour les mutants est égale à $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Pour chaque mutant, une quantité relative moyenne de transcrits *whiG* et un écart-type σ^{n-1} ont été déterminés.

Il a été montré que la quantité de transcrits *whiG* pour les trois souches n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage WT8. Par ailleurs, le niveau de transcription de *whiG* dans les trois transconjugants testés n'est pas significativement différent pour ces trois souches et est en moyenne trois fois supérieur à celui de la souche sauvage WT8. Ce résultat suggère que les deux copies de *whiG* présentes dans le génome des transconjugants seraient normalement transcrites.

Ainsi, pour les trois mutants pap1, pap2 et pap3, aucune mutation dans le gène *whiG* n'a été détectée et la transcription de *whiG* chez les trois mutants testés est similaire à celle de la souche sauvage WT8. La modification qui conduit au phénotype Pig-pap pourrait se situer au niveau post-transcriptionnel.

2.2.4. Le gène *whiH* n'est pas transcrit chez les mutants Pig-pap

La première approche choisie pour détecter la production de la protéine WhiG dans les mutants Pig-pap a été une approche par Western blot en utilisant deux types d'anticorps reconnaissant deux régions spécifiques de la protéine WhiG (Tan *et al.*, 1998). Ces anticorps nous ont été fournis par Keith Chater de l'institut John Innes à Norwich. Les essais préliminaires n'ont pas permis l'obtention de résultats interprétables.

La deuxième approche a alors consisté à déterminer si le gène *whiH* était transcrit chez les mutants Pig-pap. En effet, chez *S. coelicolor* et *S. aureofaciens*, il a été montré que la transcription du gène *whiH* codant une protéine impliquée dans le processus de régulation qui conduit à la sporulation est régulé par le facteur σ^{WhiG} (Ryding *et al.*, 1998; Kormanec *et al.*, 1999).

A partir d'extraits d'ADNc obtenus de cultures sur milieu solide âgées de 48 heures, testés comme décrit précédemment, les transcrits spécifiques à *whiH* ont été amplifiés à l'aide du couple d'oligonucléotides H1/H2 (tableau 1 de l'article n°2). Aucun transcrit correspondant à *whiH* n'a été détecté pour les trois souches mutantes pap1, pap2 et pap3 (figure 6 de l'article n°2). Etant donné que l'introduction du gène *whiH* ne complémente pas le phénotype mutant Pig-pap, ce résultat suggère que le facteur σ^{WhiG} n'est pas fonctionnel chez les mutants Pig-pap.

2.3. Le transgène *whiG* est une cible mutationnelle chez les mutants Pig-pap

L'introduction d'une copie du gène *whiG* de *S. coelicolor* dans le mutant pap3 restaure un phénotype sauvage : la pigmentation grise, la sporulation ainsi que l'apparition de papilles blanches sur les colonies du transconjugant. Cette dernière caractéristique suggère que la suppression du phénotype mutant est également mutable. Nous avons ainsi étudié d'un point de vue phénotypique et moléculaire des papilles isolées de différentes colonies du transconjugant pap3(*whiG*). Ainsi, dix papilles issues d'événements mutationnels indépendants ont été analysées. Ces mutants sont nommés de pap3Gp1 à pap3Gp10.

2.3.1. Caractérisation phénotypique des mutants issus du transconjugant

Après repiquage des dix papilles et sous-clonage, les colonies des dix mutants présentent un phénotype très semblable à celui des colonies des mutants Pig-pap, pap1, pap2 et pap3. En effet, elles sont totalement dépigmentées et aucune spore n'a été observée en microscopie photonique après coloration de Gram des fragments mycéliens de chacune de ces dix souches. De plus, pour préciser le phénotype, une observation en microscopie électronique à balayage a été réalisée avec une des dix souches mutantes, pap3Gp2 (voir figure 1 de l'article n°2). Comme les mutants Pig-pap et le mutant *whiG* de *S. coelicolor*, ce mutant présente des hyphes aériens droits sans spore.

2.3.2. Caractérisation moléculaire des mutants issus du transconjugant

Pour pouvoir expliquer le retour au phénotype mutant Pig-pap, nous avons vérifié si le transgène *whiG* était toujours transcrit et si le plasmide pSET152(*whiG*) était toujours intégré dans le génome de ces dix mutants.

Une approche par RT-PCR quantitative a été entreprise pour estimer la quantité de *whiG* relative dans un mutant issu d'une papille isolée sur le transconjugant pap3(*whiG*), le mutant pap3Gp2 (tableau 3). Une quantité de transcrits *whiG* similaire à celle de la souche sauvage WT8 a été détectée. Ce résultat suggère que la copie résident *whiG* est toujours transcrite comme chez la souche WT8 ou les trois mutants pap1, pap2 et pap3. Or, comparé à

ce qui a été détecté chez le transconjugant pap3(*whiG*), le transgène *whiG* ne semble plus être transcrit, ce qui pourrait expliquer le retour au phénotype mutant Pig-pap.

Le plasmide pSET152(*whiG*) a été hybridé sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de ces mutants. Sur les dix mutants, cinq (pap3Gp3, pap3Gp6, pap3Gp8, pap3Gp9 et pap3Gp10) ont effectivement perdu le plasmide, ce qui expliquerait le retour au phénotype Pig-pap. Pour les cinq autres mutants, le séquençage du transgène *whiG* a été entrepris.

Pour pouvoir séquencer uniquement le transgène *whiG* sur les deux copies de *whiG* présentes dans le génome des transconjugants (la copie résidente et la copie intégrée au niveau du site *attB* de ϕ C31), une étape d'amplification préalable a été nécessaire. Il s'agit d'amplifier par LR-PCR (Long-Range PCR) le plasmide intégré à l'aide du couple d'oligonucléotides C31.1/C31.2, ces amorces étant complémentaires aux régions adjacentes du site *attB* de ϕ C31 (tableau 1 de l'article n°2). Ensuite, les produits d'amplification ainsi obtenus ont été purifiés par gene-clean et ces produits ont été amplifiés par PCR avec les couples d'amorces G1/G2, G3/G4 et G5/G6 pour séquencer le gène *whiG* en entier (figure 2 de l'article n°2). Pour chacune des cinq souches, une mutation (délétion ou frameshift) a été détectée dans la séquence du transgène *whiG* (voir article n°2). De plus, chacune de ces mutations conduit à l'expression d'une protéine WhiG tronquée et de nature différente (figure 7 de l'article n°2). Les protéines tronquées ainsi produites ne sont pas fonctionnelles étant donné que dans tous les cas obtenus, les régions 2.4 et/ou 4.2 ne sont plus fonctionnelles car elles sont soit absentes soit différentes en terme de séquences. Ces régions sont nécessaires pour l'activité des facteurs σ car elles sont impliquées dans la reconnaissance des boîtes -10 et -35 du promoteur des gènes qu'ils régulent.

En conclusion, les dix mutants testés présentent soit une mutation frameshift dans le transgène *whiG* soit une délétion partielle ou totale du plasmide. Dans ces deux cas, cela conduit à la perte de l'activité de la protéine WhiG qui normalement complète le phénotype mutant et ce qui expliquerait le retour à la production de mutants sur des portions de la colonie. Ces résultats montrent que le gène *whiG* intégré au niveau du site *attB* de ϕ C31 est une cible d'événements mutationnels.

De plus, aucun secteur dépigmenté n'a été observé sur les colonies du transconjugant. Ce résultat indique que les événements mutationnels qui affectent le transgène *whiG* sont produits à un stade spécifique du cycle de développement. En effet, étant donné que ces événements sont détectés sous la forme de papilles blanches sur les colonies du transconjugant, le mécanisme qui conduit à la production de mutants Pig-pap serait activé pendant la différenciation du mycélium aérien.

2.4. Etude des mutants issus de papilles chez *S. coelicolor*

Chez *S. coelicolor*, des papilles blanches sont également produites sur les colonies d'une souche sauvage telle la souche M145. Dans le but de vérifier si ce phénomène de production de papilles est similaire à celui observé et décrit chez *S. ambofaciens*, trois papilles, issues de la souche sauvage *S. coelicolor* M145 et d'événements mutationnels indépendants, ont été repiquées, sous-clonées et caractérisées. Ces trois mutants ont été nommés PC1, PC2 et PC3 (PC pour Papille Coelicolor).

2.4.1. **Caractérisation phénotypique et moléculaire des trois mutants PC1, PC2 et PC3**

Au niveau phénotypique, les mutants PC1, PC2 et PC3 ne produisent plus le pigment gris associé aux spores (figure 24). Les colonies sont dépigmentées mais produisent légèrement un pigment excrété qui correspondrait à l'antibiotique actinorhodine. Après observation du mycélium aérien produit par ces trois mutants en microscopie photonique, après coloration de Gram, il a été montré que ces mutants ne sporulent pas. Par ailleurs, le phénotype des colonies est très similaire à celui des mutants *whi* identifiés chez *S. coelicolor*.

Figure 24 :
Phénotype d'une colonie de la souche mutante PC1 de *S. coelicolor*. L'observation et la photographie ont été réalisées après 14 jours de croissance sur milieu HT et le trait sous la photographie correspond à une longueur de 5 mm.

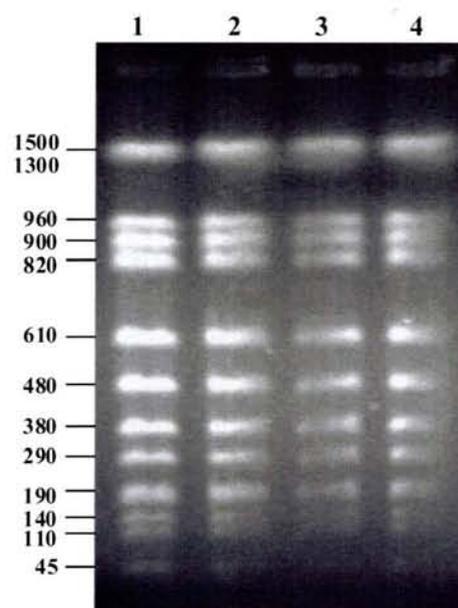


Au niveau moléculaire, l'absence de grand réarrangement génomique dans ce type de mutants a été confirmée par une analyse en PFGE de ces trois mutants. En effet, les profils de macrorestriction *AseI* obtenus pour ces trois mutants sont identiques à celui obtenu pour la souche sauvage M145 de *S. coelicolor* (figure 25).

Figure 25 :

Profils de macrorestriction *AseI* obtenus en PFGE de l'ADN génomique des souches M145 (piste 1), PC1 (piste 2), PC2 (piste 3) et PC3 (piste 4) de *S. coelicolor*.

Conditions de migration : 200 V, 24 heures, 40-160 sec et gel d'agarose à 1 %. La taille des fragments *AseI* détectés est indiquée en kb.



2.4.2. Introduction de pSET152(*whiG*) par conjugaison dans les trois mutants PC1, PC2 et PC3

Le phénotype mutant de PC1, PC2 et PC3 a été complété par introduction du plasmide pSET152(*whiG*) par conjugaison (figure 26). Pour ces trois mutants, les transconjugants obtenus après transfert de pSET152(*whiG*) sont pigmentés gris, sporulent et produisent à nouveau des papilles blanches sur les colonies alors que l'introduction de pSET152 seul ne permet pas le retour au phénotype sauvage.

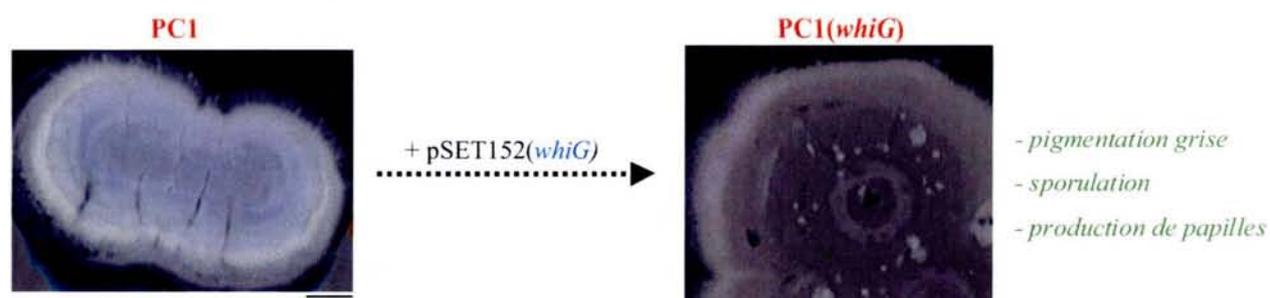


Figure 26 :

Phénotype du transconjugant PC1(*whiG*) observé après introduction du plasmide pSET152(*whiG*) dans la souche mutante PC1 de *S. coelicolor*. Les observations et les photographies ont été réalisées après 14 jours de croissance des cultures sur milieu HT et le trait sous les photographies correspond à une longueur de 5 mm.

Pour chaque mutant, l'intégration des plasmides pSET152 et pSET152(*whiG*) au niveau du site *attB* de ϕ C31 a été vérifiée par des expériences d'hybridation de chacun de ces plasmides sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des transconjugants. Ainsi, l'introduction d'une copie de *whiG* au niveau du site *attB* de ϕ C31 chez les trois mutants de *S. coelicolor* permet la restauration de la pigmentation et de la sporulation comme ce qui avait été observé pour les trois mutants *pap1*, *pap2* et *pap3* de *S. ambofaciens*. En outre, comme le mutant *pap3*, les trois mutants de *S. coelicolor* produisent des papilles blanches sur leurs colonies (figure 26). Ce résultat suggère que le transgène *whiG* pourrait ne pas être fonctionnel chez ces papilles. Cette non fonctionnalité laisse supposer que le phénomène décrit pour le transconjugant *pap3(whiG)* de *S. ambofaciens* existerait également chez *S. coelicolor*.

2.4.3. Analyse moléculaire du gène *whiG* chez les trois mutants PC1, PC2 et PC3

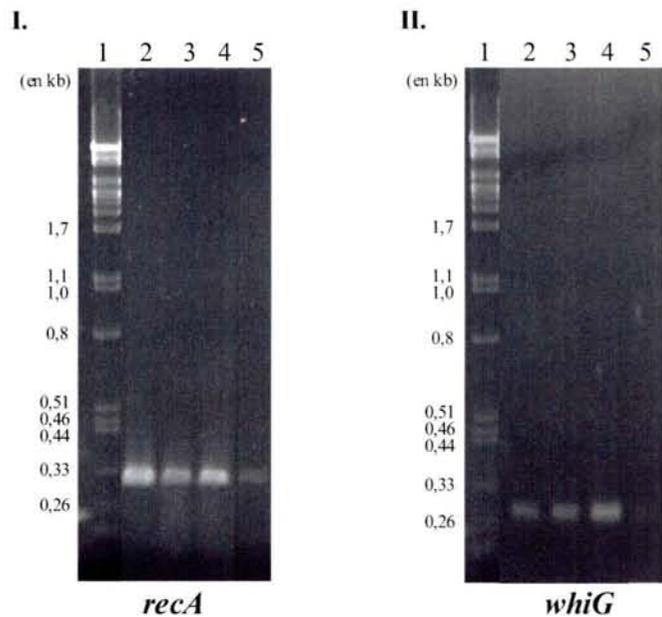
Le gène *whiG* des trois mutants de *S. coelicolor* a été séquencé à l'aide des trois couples d'oligonucléotides utilisés pour séquencer le gène *whiG* chez *S. ambofaciens* (tableau 1 et figure 2 de l'article n°2). Aucune différence dans la séquence nucléotidique n'a été détectée sur les 1213 nucléotides qui recouvrent la totalité du gène *whiG* pour la souche sauvage M145 et les trois mutants PC1, PC2 et PC3 de *S. coelicolor*. Ainsi, comme pour les mutants *Pig-pap*

de *S. ambofaciens*, le gène *whiG* n'est pas muté chez les mutants caractérisés chez *S. coelicolor*.

Nous avons alors testé si le gène *whiG* était transcrit chez les trois mutants PC1, PC2 et PC3 par une approche de RT-PCR. Pour cela, les ARN totaux ont été extraits à partir de cultures sur milieu HT solide des différentes souches (M145, PC1, PC2 et PC3) après 48 heures de croissance à 30°C. Une transcription inverse a été réalisée dans les conditions décrites précédemment. Pour chaque souche, l'essai et les différents témoins de RT-PCR ont été utilisés pour une amplification par PCR à l'aide des amorces Rec1/Rec2 complémentaires à une région spécifique de l'ORF de *recA* (tableau 1 de l'article n°2), ce qui a permis de valider les échantillons d'ADNc et de poursuivre l'expérience (figure 27 I.). Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides G7/G8 (tableau 1 de l'article n°2) qui permet d'amplifier spécifiquement les transcrits correspondant à *whiG*. Pour chacune de ces souches, un produit d'amplification spécifique à *whiG* a été obtenu, ce qui montre que ce gène est transcrit chez les trois mutants analysés (figure 27 II.).

Figure 27 :

Mise en évidence de la transcription des gènes *recA* (I.) et *whiG* (II.) chez la souche sauvage M145 et les trois mutants Pig-pap de *S. coelicolor*. Les profils ont été obtenus après amplification des ADNc à l'aide des couples d'amorces Rec1/Rec2 et G7/G8. Ces ADNc ont été obtenus après RT-PCR, à partir d'extraits d'ARN totaux de cultures de 48 heures sur milieu solide, de M145 (piste 2), PC1 (piste 3), PC2 (piste 4) et PC3 (piste 5). La piste 1 correspond au marqueur de taille, l'ADN du bactériophage λ digéré par *PstI* et la taille de quelques fragments de restriction *PstI* est indiquée en kb. La migration a été réalisée dans un gel d'agarose à 2,5 % en TAE 1X, à 2 V/cm pendant 16 heures.



En conclusion, la caractérisation phénotypique et moléculaire des mutants issus de papilles blanches de *S. coelicolor* a permis de mettre en évidence un phénomène similaire à celui décrit chez *S. ambofaciens*. Les mutants isolés de papilles blanches présentent un phénotype « *whiG*-like » : ils sont dépigmentés et non sporulants. De plus, l'introduction d'une copie du gène *whiG* de *S. coelicolor* supprime le phénotype mutant. Par ailleurs, nous avons montré dans ce travail qu'une mutabilité affectant le transgène *whiG* expliquerait le retour à la production de mutants au sein des colonies des transconjugants pap3(*whiG*), PC1(*whiG*), PC2(*whiG*) et PC3(*whiG*). Une approche moléculaire a, par ailleurs, été entreprise dans le but d'identifier la nature moléculaire du déterminisme du phénotype Pig-pap. Il a été ainsi montré que bien que le phénotype Pig-pap soit complémentable par introduction du gène *whiG*, ce gène n'est pas muté chez tous les mutants testés et il est bien transcrit. Ainsi, ces résultats laissent supposer que :

- ❖ l'expression du gène *whiG* pourrait être modifiée à haute fréquence au niveau post-transcriptionnel, par exemple par un ARN antisens ou une protéase de type Clp,
- ❖ ou, un régulateur tel un facteur anti- σ ou anti-anti- σ pourrait être un gène mutable et ainsi une modification de la régulation de *whiG* conduirait au phénotype Pig-pap.

Ces résultats ont fait l'objet de deux communications (une affiche et une communication orale, voir annexes) et font l'objet de l'article n°2 accepté pour *Research in Microbiology*.

2.5. Article n°2



Article n°2

The sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of mutational phenomenon occurring during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877

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



The sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of mutational phenomenon occurring during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877

Catakli Sibel, Andrieux Axelle, Decaris Bernard, Dary Annie*

Laboratoire de Génétique et Microbiologie (UMR INRA/UHP 1128), IFR 110, Faculté des Sciences de l'UHP, Nancy 1, BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

(*): corresponding author

Keywords: *Streptomyces*, differentiation, *whi* genes, sigma factor, genetic instability.

Abstract

The genetic instability of *Streptomyces ambofaciens* affects the pigmentation of colonies and this occurs at different stages of development. Among the variety of mutants generated by this phenomenon, the Pig-pap mutants, which derive from white papillae observed on the surface of grey pigmented wild-type (WT) colonies and which result from a genetic instability event occurring during the aerial mycelium growth, display specific features. They are white, do not sporulate, do not harbour any detectable genome rearrangement and constitute a new aspect of genetic instability. To investigate it, three Pig-pap mutants originating from three independent mutational events were characterised. Although these mutants exhibited a *whiG*-like phenotype and were complemented by introducing a copy of *S. coelicolor whiG*, they were devoid of mutation in their own *whiG*. While this gene seemed to be transcribed at a similar level in the mutants and in the WT, *whiH*, whose expression depends on σ^{WhiG} , was not transcribed in any of the three Pig-pap mutants, suggesting that the σ^{WhiG} was absent or inactive. This suggests therefore that in these Pig-pap mutants, the regulation of σ^{WhiG} might

be affected. Finally, the introduction of *S. coelicolor whiG* in one of these Pig-pap mutants not only restored pigmentation and sporulation but also the ability to form white papillae again. Analyses of the transgene *whiG* in these papillae revealed that it constitutes a mutational target when integrated in the genome of this Pig-pap mutant.

Introduction

Streptomyces are Gram+ mycelial soil bacteria which undergo a complex cycle of morphological differentiation. On solid medium, spore germination gives rise to the vegetative mycelium with interconnected hyphae from which the aerial mycelium expands and differentiates into coiled chains of mature spores [12,13,24]. The onset of the formation of aerial hyphae coincides with the emergence of secondary metabolism, which results in the production of a variety of antibiotics and other compounds such as pigments [5,51].

In *Streptomyces coelicolor*, the study of differentiation process led to the identification of many genes encoding diverse functions. They can be split into two classes of genes grouped on the basis of the differentiation step they interact with. The first class, including the *bld* genes (for bald), is essential for the aerial mycelium erection while the second, among which are the *whi* genes (for white), is implicated in the formation of mature pigmented spores [13,37]. Therefore, *bld* mutants lack an obvious aerial mycelium while *whi* mutants produce an aerial mycelium that does not generate mature spores and remains white. In addition, a characteristic aerial conformation, corresponding to the impairment in different steps of the sporulation process distinguishes the different *whi* mutant phenotypes [1,13,20]. The *whi* genes have been qualified as “early” or “late” genes. At least six “early” *whi* genes (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* and *whiJ*), required for achieving full septation of the aerial hyphae, have been identified in *S. coelicolor*. To our knowledge, six “late” *whi* genes (*sigF*, *whiD*, *whiE*, *whiL*, *whiM* and *whiO*), involved in the maturation of spores and the synthesis of spore pigment, have been identified in the same species. Finally, as his role during aerial differentiation remains unknown, the *whiK* and *whiN* (renamed *bldN*) genes are qualified as “indeterminate” [6,10,14,38]. Although the function encoded by some of the *whi* genes (*whiA*, *whiJ*, *whiL*, *whiM* and *whiO*) remains yet unknown [2,21,47], the others encode a type II polyketide synthase (the *whiE* cluster) [15,24], DNA-binding proteins (*whiB* and *whiD*) [38],

RNA polymerase sigma factors (*whiG*, *sigF* and *whiN*) [6,11,23,42], a regulatory protein (*whiH*) [46] or response regulators (*whiI* and *whiK*) [1,38]. In brief, sporulation results from a complex network of gene interactions and regulatory events [14].

whiG is similar to the genes encoding the sigma factors σ^D of *Bacillus subtilis* and σ^F of coliform bacteria, both controlling expression of motility and chemotaxis genes [3,39]. Homologues of WhiG have been identified in other *Streptomyces* species such as *S. avermitilis* [41], *S. griseocarnum* [49] and *S. aureofaciens* [26]. Such conservation among various *Streptomyces* species shows that the sigma factor encoded by *whiG* is important in the differentiation of this bacterium. All of these sigma factors belong to the σ^{70} family and are characterised by four conserved regions, of which, 2.4 and 4.2 (highly conserved) involved in -10 and -35 promoter sequence recognition for the genes that these sigma factors regulate [8,32]. In *S. coelicolor*, the RNA polymerase sigma factor WhiG is absolutely required for the shift from aerial growth to sporulation [11,23,36]. Consequently, a *whiG* mutant presents straight aerial hyphae [10,20]. σ^{WhiG} activates the promoter of the two “early” *whiH* and *whiI* genes and of *orfTH4*, which encodes a ProX-like protein implicated in glycine betaine transport induced by hyperosmotic stress [1,47,50]. In *S. aureofaciens*, *rpoZ*-encoded sigma factor regulates also the transcription of *whiH* [27] and that of the *ren71* gene, which encodes a putative protein similar to hydrolase that is involved in the degradation of lignin-related biphenyl compounds [28]. The regulation of *whiG* seems to be complex and remains unclear [14]. In *S. coelicolor*, while the *whiG* promoter is expressed at a rather constant level throughout growth, σ^{WhiG} is only active during the beginning of the sporulation process [18,23]. Recently, the characterisation of the transcriptional factor BldD, which is required for aerial mycelium formation in *S. coelicolor*, showed that it is a regulator of the expression of *whiG* during vegetative growth [18]. It is not known what causes σ^{WhiG} activation at the beginning of aerial mycelium formation. *whiG* could be submitted to a post-transcriptional regulation exerted by an anti- σ factor. However, despite the close similarities of σ^{WhiG} to σ^{FliA} of *S. typhimurium*, no *flgM* homologue, which encodes the anti- σ^{FliA} factor, has been found in the *S. coelicolor* genome sequence [14,40]. This suggests that if the *whiG* post-transcriptional regulation implies an anti- σ factor, this last would be quite different from FlgM.

Streptomyces species are characterised by a high level of genetic instability that preferentially affects characteristics of secondary metabolism. In *Streptomyces ambofaciens*,

the differentiation of colony, particularly its pigmentation, is affected by the genetic instability. In the offspring of a grey pigmented wild-type (WT) colony, pigment-defective mutants are frequently detected [29]. These mutants could be produced at different steps of colony development. Pigment-defective sectors might result from a mutational event during vegetative mycelium growth. White papillae could arise from a mutational event during aerial mycelium growth while pigment-defective colonies could be produced during sporulation [29,34]. Pigment-defective mutants deriving from either a colony or a sector (called respectively Pig-col and Pig-sec) frequently display large genome rearrangements such as deletions and/or amplifications. On the other hand, pigment-defective mutants deriving from white papillae (called Pig-pap), greatly differ from the others since they are devoid of any large genome rearrangement [35]. In addition, contrary to the phenotypic heterogeneity observed among the Pig-col and Pig-sec mutants, none of the Pig-pap mutants sporulate and all are white [34]. This class of mutants constitutes a new type of mutants generated by genetic instability in *S. ambofaciens*.

Here, we report the phenotypical and genetic characterisation of three Pig-pap mutants isolated from independent mutational events in *S. ambofaciens*. The phenotype of these mutants was very similar to a *S. coelicolor* WhiG mutant phenotype and complemented by introduction of a copy of *S. coelicolor whiG*. In the three mutants, the endogenous *whiG* was not mutated and was transcribed at a level similar to that of the WT strain and *whiH*, whose expression depends on an active σ^{WhiG} , was not transcribed. Thus, the Pig-pap mutant phenotype could result from a mutational event affecting the translational regulation of *whiG*. Moreover, for one of these Pig-pap mutants, after introduction of *S. coelicolor whiG*, a return of the capacity to produce white papillae again was observed. The characterisation of several of these mutants showed us that they have been generated by a new mutational phenomenon that affects the *whiG* transgene at a very high frequency.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Streptomyces strains studied in this work derived from *S. ambofaciens* ATCC23877, whose genetic instability has been detailed in previous works [34,35]. The Pig-pap mutants (pap1, pap2 and pap3) derived from white papillae isolated from the WT subclones WT8, WT1 and WT12 of the strain ATCC23877 respectively [34]. For the transcriptional experiments, the WT sub-clone WT8 was used as reference. The strains pap1(pSET152), pap2(pSET152), pap3(pSET152), pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) and pap3(*whiG*) derived from 1 exconjugant of pap1, pap2 or pap3 containing either the plasmid pSET152 or the plasmid pSET152(*whiG*). The strains pap3Gp1 to pap3Gp10 derived from ten papillae isolated from the strain pap3(*whiG*) and sub-cloned two times on HT solid medium without selection to obtain a homogeneous progeny. The absence of apramycin in the medium permitted to compare in the same conditions the phenotype of the different *S. ambofaciens* strains. To ensure that, in these conditions, pSET152 and pSET152(*whiG*) were not highly unstable, we estimated the frequency of loss of apramycin resistance, which is conferred by these plasmids. After introducing each plasmid in WT8, two exconjugants, WT8(pSET152) and WT8(pSET152(*whiG*)), were grown on HT solid medium without apramycin for four days. The colonies were then replicated on HT solid medium supplemented with apramycin. Apramycin sensitivity of the colonies, which did not grow on this medium was checked by growing then again on HT solid medium without apramycin. For each plasmid, the loss of apramycin resistance was estimated below to 10^{-5} .

S. coelicolor WT strain M145 and the *whiG* mutant C71 were used for microscopical observations. *E. coli* MRF'307 (resistant to tetracyclin and kanamycin) [9] was used as host for cloning and for conjugation experiments.

Streptomyces strains were grown at 30 °C in Hickey-Tresner (HT) liquid or solid medium [43] and in YEME liquid medium for pulsed-field gel electrophoresis [22]. *E. coli* strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) liquid or solid medium [48]. Conjugation between *E. coli* and *S. ambofaciens* was done on AS-1 medium [4]. Antibiotics were used at

the following final concentrations: ampicillin, 50 µg/ml; apramycin, tetracyclin and kanamycin at 30 µg/ml (Sigma).

Plasmids and conjugation procedures

The DNA of the plasmids pIJ6204, pIJ2157, pIJ6301, pIJ6201 and pIJ6205 (kindly gift by Pr. K. Chater) containing respectively the *S. coelicolor* genes *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* and *whiJ* was digested by *Xba*I to release a fragment, containing the corresponding *whi* gene, of 7 kb from pIJ6204, 6 kb from pIJ2157, 2 kb from pIJ6301, 5.1 kb from pIJ6201 and 4 kb from pIJ6205. Each fragment was cloned into the *Xba*I site of the plasmid pSET152 (5.9 kb) to generate pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET52(*whiG*), pSET52(*whiH*) and pSET152(*whiJ*). The plasmid pSET152 can be transferred from *E. coli* to *Streptomyces* and integrated at the bacteriophage ϕ C31 *attB* chromosomal site in *Streptomyces* [7]. *E. coli* MRF'307 was transformed by pSET152 or one of the five recombinant plasmids under standard conditions previously described by Dower *et al.* [17]. The transformants were selected on LB solid medium supplemented with tetracyclin, kanamycin, apramycin, X-gal (80 µg/ml) and IPTG (48 µg/ml) then mated with the three Pig-pap *S. ambofaciens* mutants using the procedure described by Baltz *et al.* [4]. Exconjugants were selected by adding apramycin and ampicillin, replicated on HT solid medium and their phenotype was observed after 14 days of incubation at 30 °C.

Pulsed-field gel electrophoreses, DNA extractions and Southern blot analyses

Pulsed-field gel electrophoresis procedure was performed as previously described [31]. *S. ambofaciens* total DNA was extracted as described elsewhere [19] and restriction enzymes were used under the conditions recommended by the suppliers (New England Biolabs). DNA fragments were separated on agarose gels according to Sambrook *et al.* [48]. Southern blotting, prehybridisation and hybridisation were performed as previously described [16]. Labelling of probes and detection of specific hybrids were performed using the DIG-DNA labelling and detection kit, under the supplier conditions (Roche Molecular Biochemicals).

To check the integration of each plasmid, two exconjugants deriving from pap1, pap2 and pap3 mated with *E. coli* MRF'307 containing either pSET152 or pSET152 with *whiA*, *whiB*, *whiH* and *whiJ*, were randomly selected. Fourteen exconjugants obtained after introduction of pSET152(*whiG*) in pap1, six for pap2 and pap3 were analysed. Each plasmid was hybridised against *Bam*HI-digested genomic DNA of the different exconjugants. Two *Bam*HI fragments (11 kb and 6 kb) were typically revealed after hybridisation with pSET152 [9]. It must be noted that the *Bam*HI site of pSET152 is located near the *Xba*I site used for the cloning. As no *Bam*HI site is present in the 7 kb fragment which contains *whiA*, hybridisation using pSET152(*whiA*) revealed 2 *Bam*HI fragments of 11 kb and 13 kb. A *Bam*HI site being situated at one extremity of the 6 kb fragment containing *whiB*, a 11 kb *Bam*HI fragment and 2 *Bam*HI fragments of 6 kb were revealed after hybridisation with pSET152(*whiB*). For pSET152(*whiH*) and pSET152(*whiJ*), where *whiH* and *whiJ* are located respectively on a of 5.1 kb and 4 kb fragment, one *Bam*HI site is present in each fragment leading, after hybridisation with each of these plasmids, to the revelation of the 11 kb *Bam*HI fragment and 2 others fragments of 8.7 kb and 2.4 kb for pSET152(*whiH*) and of 7.8 kb and 2.2 kb for pSET152(*whiJ*). Finally, the fragment of 2 kb containing the *whiG* gene of pSET152(*whiG*) presents 2 *Bam*HI fragments separated by 40 bp in the middle of the fragment and another at one extremity of the fragment. The hybridisation of this plasmid against genomic DNA digested by *Bam*HI of the exconjugants revealed 4 fragments of 11 kb, 6 kb, 1.1 kb and 0.9 kb.

Sequencing of *S. ambofaciens whiG*

Three couples of oligonucleotides, G1/G2, G3/G4 and G5/G6, deduced from the genome sequence of *S. coelicolor* (NC_003888), were designed to amplify and sequence the complete copy of *whiG* in *S. ambofaciens* or the *whiG* transgene of *S. coelicolor* (Table 1; Fig. 1). Each PCR product was sequenced using the DNA sequencing kit (Applied Biosystem) and the ABI Prism 310 system. The sequence of *S. ambofaciens whiG* has been deposited in the GeneBank database (AY_497380). Sequence comparisons and alignments were performed with the BioEdit software with ClustalW algorithm and the search of homology in the databases were performed using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

PCR and Long Range PCR (LR-PCR) methods

Each amplification was realised in a reactional volume of 20 µl with 1 U of Taq DNA polymerase (Biolabs), 200 ng of genomic DNA, 10 µM of dNTP and 25 pmol of each of the primers used. After a first denaturation step of 4 min at 94 °C, the reaction mixture was subjected to 30 cycles of three steps of 30 sec (denaturation at 94 °C, annealing at the adequate temperature (Table 1) and extension at 72 °C) followed by a final extension step of 7 min at 72 °C. Checking for the presence of pSET152 integrated into the *attB* site in exconjugant papillae and sequencing of the *whiG* transgene were realised by LR-PCR. The amplification was carried out in a reactional volume of 20 µl using 1 U of Takara La Taq (Takara Bio Inc.), 200 ng of genomic DNA as a template and 25 pmol of the primers C31.1 and C31.2 (Table 1). The reaction mixture was heated at 94 °C for 1 min and subjected to 30 cycles of 5 sec at 98 °C, 1 min at 50 °C and 3 min 30 at 68 °C and to a final step of extension of 10 min at 72 °C. Under these conditions, a fragment of 8 kb was obtained.

Total RNA isolation from surface-grown culture of S. ambofaciens

Streptomyces strains were grown at 30 °C on cellophane discs on the surface of HT solid medium during 24 h, 36 h, 48 h, 72 h or 96 h. About 100 mg of mycelium was disrupted on ice by sonication (2X10 sec; 60 W) in 1 ml of Trizol Reagent (Invitrogen), consisting of a mix of phenol and guanidine isothiocyanate. After 10 min incubation at room temperature, 0.2 ml of chloroform was added and the aqueous phase was recovered after centrifugation at 15000 g for 10 min at 4°C. RNA pellet was recovered after addition of 0.5 ml isopropyl alcohol followed by incubation for 10 min at room temperature and a centrifugation at 15000 g for 20 min at 4 °C. RNA pellet was then washed in 1 ml of 75 % ethanol, dried and resuspended in 0,1 ml of RNase free water. Finally, purity and concentration of the RNA were estimated respectively by the ratio OD_{260nm}/OD_{280nm} and by the OD_{260nm}.

Reverse Transcription PCR method

Reverse transcription of mRNA was performed in a 25 µl reaction volume. The first step consists of mixing 2 µg of the random hexamers (pDN6) (Amersham) with about 3 µg of total RNA for 5 min at 70 °C. Then, 1 U of DNaseI (Amersham), 1 U of the RNase inhibitor

RNA guard (Amersham) and 10 μ M of dNTP were added and the reaction mixture incubated for 20 min at 37 °C. The DNaseI was inactivated by heating 5 min at 95 °C. Before adding the reverse transcriptase, 2 μ l were used in a PCR reaction in order to confirm the absence of genomic DNA. One U of MMLV reverse transcriptase (Amersham) was added in the remaining reaction mixture and incubated for 60 min at 37 °C to generate single strand cDNA. The *whiG*, *recA*, *hrdB* and *whiH* cDNAs were amplified by the Taq DNA polymerase (Biolabs) in the presence of 1 μ l of total cDNAs using respectively the couples of primers, G7/G8, G9/G10, Rec1/Rec2, HrdB1/HrdB2 and H1/H2 (Table 1), following the instructions of the manufacturer (MWG). The primers Rec1/Rec2, HrdB1/HrdB2 and H1/H2 sequences were deduced from the *S. coelicolor* genome sequence available in the GeneBank database. The couple of primers G9/G10 was especially chosen for the quantitative reverse transcription PCR following the instructions given by Invitrogen. The oligonucleotides G7/G8 and G9/G10 whose sequences were deduced from the *S. ambofaciens whiG* sequence investigated in this work, are located in conserved and specific regions of the homologues of WhiG in *Streptomyces* species. Indeed, G7 and G9 match the region 2.2, G10 the region 2.3 and G8 the region 3 (Fig. 2; Fig. 3). Finally, the PCR products obtained after amplification of WT8 genomic DNA with G7/G8 and H1/H2 were sequenced to verify that these primer sets amplified *whiG* and *whiH* respectively.

Quantitative Reverse Transcription PCR method

Amplification and detection of a specific product were performed using the iCyclerIQ Multi-Color real-time PCR detection system (Biorad). PCR products were detected with the SYBR Green fluorophore that binds to double-stranded DNA during PCR amplification. The reaction mix contained cDNA, specific primers (10 pmol of each), and SYBR Green mix (Invitrogen). The reaction steps were 95 °C for 10 min, 60 cycles of 95 °C for 30 sec, 60 °C for 1 min. All of the amplifications were made in duplicates. Fluorescent signal was acquired during each extension phase.

The relative expression of *whiG* in the WT or mutant strains was determined using the threshold cycles (Ct) value by normalising the level of *whiG* transcription with the level of *hrdB* transcription in each sample. We assumed that the *hrdB* transcription level is similar in all of the strains tested, since this gene encodes a sigma factor regulating many genes involved in basal metabolism. The level of *whiG* transcript in WT8 was fixed at 1 and the

relative amount of *whiG* transcript in each mutant strain was compared to WT8. The relative increase or decrease of *whiG* transcript in the mutants was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ABI Biosystems).

The results were validated by two different ways. First, the efficiency of the amplification of each gene was assessed using a calibration curve based on the Ct value of genomic DNA of WT8 [45]. The reference gene (*hrdB*) curve and the target gene (*whiG*) curve were both constructed by a cascade of dilutions: 0, 1/210, 1/90, 1/30 and 1/10. Second, the quality of the primers used for the amplification and the presence of aspecific product amplification was determined by establishing the melting curve for the primers. This melting curve was generated by heating the sample up to 95 °C followed by cooling down to 55 °C for 10 sec and slowly heating the sample at 0.5 °C per 10 sec until 95 °C. Loss of fluorescence is observed at the denaturing/ melting temperature of the product [44].

Microscopical analyses

Two alternative methods were used to determine the capacity of a strain to sporulate. The first one consisted to observe by light microscopy, after a Gram staining, fragments of colony grown 7 days on HT solid medium at 30 °C [34]. The second consisted to observe in scanning electron microscopy (SEM), mycelial fragments issued from cultures grown during 60 h on HT solid medium at 30 °C. Fragments were fixed with osmic acid (2 %) in a dessicator during 48 h. After drying out, samples were pasted in their support, metallised with palladium gold (SC7640 Sputter Coater POLARON) and then observed in SEM (CAMBRIDGE STEREOSCAN S240).

Results

The Pig-pap mutants of S. ambofaciens exhibit a WhiG-like mutant phenotype

The Pig-pap mutants derive from white papillae observed on the surface of the majority of pigmented colonies after 14 days of growth of *S. ambofaciens* ATCC23877 [34,35]. The 3 mutants characterised in this work, pap1, pap2 and pap3, were isolated in previous work as follows [34]. One papilla was carefully picked up using a toothpick from WT8, WT1 and WT12 respectively and subcultured 2 or 3 times, each time choosing a white colony, until the progeny of each Pig-pap mutant was homogeneous. The 3 mutants, as the other Pig-pap mutants, were white and showed no sign of sporulation after observation of the mycelium by light microscopy. To ensure that WT genomes did not co-exist with mutant genomes and to evaluate the reversion rate of the 3 mutants, pap1, pap2 and pap3, about 50,000 colonies were plated on HT solid medium and observed after 14 days of growth. No revertant, i.e. pigmented colony, was observed for each mutant, suggesting that they displayed a relatively stable phenotype (reversion rate below 2.10^{-5}). To verify the absence of large genome rearrangements, *AseI* restriction profiles of the WT strain and of the three Pig-pap mutants were performed and no rearrangement was detected (data not shown). Therefore, unlike the other mutants (the Pig-col and Pig-sec mutants), which frequently harbour large genome rearrangements and whose progeny is often heterogeneous and contains pigmented colonies [29], the Pig-pap mutants are different and perhaps result from a different mechanism causing genetic instability.

The phenotype of each mutant was specified by scanning electron microscopy (SEM). After growing on HT solid medium for 60 h, mycelial fragments from the strain WT8 and from the three mutants were analysed (Fig. 1). For the strain WT8, abundant spore-coiled chains were observed (Fig. 1 A). Conversely, for the three mutants, no sign of sporulation was detected since the aerial hyphae remained straight without any apparent sign of septation (Fig. 1 B, C and D). As this phenotype was very similar to that of *S. coelicolor* WhiG mutants previously reported [10,20], mycelial fragments of the WT strain M145 and of the *whiG* mutant C71 of *S. coelicolor* were observed in the same conditions (Fig. 1 E and F). A great similarity between the WhiG mutant phenotype of the strain C71 and that of the three Pig-pap mutants studied here was observed. This shows that the mutants pap1, pap2 and pap3 are blocked early during this step of colony development.

The Pig-pap mutant phenotype is complemented by the introduction of whiG of S. coelicolor

As the Pig-pap mutants were blocked at the first steps of sporulation, we tried to complement their deficiency by introducing 5 *whi* genes (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* and *whiJ*) of *S. coelicolor*, known to be involved in the first steps of the sporulation process. The presence of the homologues of these 5 *whi* genes was examined in *S. ambofaciens* by hybridising the plasmids pIJ6204, pIJ2157, pIJ6301, pIJ6201 and pIJ6205 containing each of these genes against *Bam*HI-digested genomic DNAs of WT8 and the three Pig-pap mutants. Single *Bam*HI fragments for *whiA* (21 kb), *whiB* (19 kb), *whiH* (2.7 kb), *whiJ* (2.4 kb) and two *Bam*HI fragments for *whiG* (3.8 and 9.7 kb) were revealed for each strain indicating that the 5 *whi* genes were not deleted in these mutants (data not shown). Further, all the results obtained by hybridising the plasmid pSET152 (*whiG*) (see below) and various restriction patterns of genomic DNA of the WT and the 3 mutants were consistent with the presence of one copy of *whiG* in the genome (data not shown). The *S. coelicolor whi* genes were first cloned in the conjugative plasmid pSET152. The native and the 5 recombinant plasmids were introduced in *E. coli* MRF'307 and transferred by conjugation in the Pig-pap mutants.

The exconjugants obtained after the introduction of pSET152 or pSET152 containing *whiA*, *whiB*, *whiH* or *whiJ* remained white and did not sporulate (Table 2). In contrast, the introduction of *whiG* in the 3 mutants restored both pigmentation and sporulation with two different phenotypes observed. For pap1 and pap2, all of the exconjugants produced a slightly grey pigmentation and sporulated. In addition to the restoration of pigmentation and sporulation, all of the exconjugants derived from pap3 produced white papillae again.

In order to verify the integration of each plasmid, one or 2 exconjugants deriving from pap1, pap2 and pap3 after conjugation with pSET152 or pSET152 containing *whiA*, *whiB*, *whiH* or *whiJ* were randomly selected. Finally, 14 exconjugants of pap1 and 6 exconjugants of pap2 and pap3 were analysed after introduction of pSET152(*whiG*). Each plasmid was hybridised against *Bam*HI-digested genomic DNAs of the different exconjugants. For each exconjugant, we observed that only one copy of each plasmid was integrated at the *attB* site located in the C'' *Ase*I fragment [9] (data not shown).

One exconjugant colony, obtained after each mating of pap1, pap2 and pap3 with the *E. coli* strain MRF'307(pSET152(*whiG*)), was sub-cloned. Each strain was named

pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) and pap3(*whiG*). Light microscopy showed sporulation in pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) and pap3(*whiG*) and different colony phenotypes were observed by SEM (Fig.1 G, H and I). All of them sporulated though the spores observed for pap3(*whiG*) appeared to be more completely septated and rounded than those observed for pap1(*whiG*) and pap2(*whiG*). Therefore, these results show that the introduction of one copy of *whiG* is sufficient to restore the sporulation process in the 3 mutants and such a complementation implies that the WT phenotype is dominant on the Pig-pap mutant phenotype. This observation associated with the absence of segregation of WT genomes in the progeny of the 3 Pig-pap mutants strongly suggest that no genotypic heterogeneity, consisting in a mix of WT and mutant genomes, existed in the Pig-pap mutants analysed here.

The whiG gene is not mutated in the Pig-pap mutants

Sequencing of *whiG* in WT8 and in the three Pig-pap mutants of *S. ambofaciens* was performed. The *S. coelicolor* and *S. ambofaciens whiG* sequences share 90.2 % of similarity at the nucleotide level (Fig. 2). Moreover, WhiG of *S. ambofaciens* presents 98.4 % of identity with WhiG of *S. coelicolor*, 95.4 % of identity with WhiG of *S. avermitilis*, 91.4 % (1 gap of 2 aminoacids) with WhiG of *S. griseocarnum*, 91 % (1 gap of 2 aminoacids) with RpoZ of *S. aureofaciens* (Fig. 3). In addition, the comparison of WhiG of *S. ambofaciens* with its homologue in other species shows a high sequence conservation in the 2.4 and 4.2 regions which are highly conserved between the σ^{WhiG} homologues and respectively involved in -10 and -35 promoter sequence recognition. Indeed, no aminoacid difference (except one for WhiG of *S. griseocarnum* in the region 4.2) was detected for all of these alignments in the regions 2.4 and 4.2 (Fig. 3). Thus, these data suggest that WhiG of *S. ambofaciens* could regulate the same genes as that of the other *Streptomyces* WhiG sigma factors and notably *whiH* and *whiI* of *S. coelicolor* [1,47] and the homologue of *whiH* in *S. aureofaciens* [27].

Finally, the *whiG* gene sequence of each Pig-pap mutant was found to be completely identical to that of WT8. Thus, the 3 mutants whose pigmentation and sporulation were restored after the introduction of one copy of *S. coelicolor whiG*, did not harbour any mutation in the *whiG* sequence. This result suggests the genetic modification behind the Pig-pap mutant phenotype might be transcriptional or post-transcriptional.

whiG is transcribed in the Pig-pap mutants

The transcription of *whiG* in the three mutants was investigated using reverse transcription PCR (RT-PCR). In previous works, it was observed that the growth curves of the three Pig-pap mutants established by growing them in liquid medium were similar with that of the WT8. Further, on solid medium, the development of the colonies of the three Pig-pap mutants, except for the sporulation, appeared to be very similar to that of the WT colonies. Especially, the Pig-pap mutants colonies were not significantly different in size than those of the WT (unpublished results). Total RNAs were isolated from plate-grown cultures, reverse-transcribed and the *whiG* cDNAs were amplified using the two specific primers G7/G8 (Table 1 and Fig. 2). For WT8 and *pap1*, RNAs were isolated at different growth times (14 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h) corresponding to the different stages of colony development (vegetative mycelium, aerial mycelium and sporulation). A *whiG* transcript was detected for both strains at all growth times tested (Fig. 4). As the apparent lower expression of *whiG* in the vegetative hyphae of *pap1* was also observed in the WT in other assays, it was not considered. The same experiments were realised on the strains *pap2* and *pap3* grown for 48 h, a period corresponding to the beginning of sporulation and a specific *whiG* transcript was also detected in both strains (data not shown).

As the RT-PCR is not quantitative, the amount of *whiG* transcript was estimated in the strains WT8, *pap1*, *pap2* and *pap3* by quantitative RT-PCR to determine whether the level of transcription of the *whiG* gene in the 3 mutants differed from that of the WT. Total RNAs were isolated from surface cultures of the 4 strains grown 48 h and reverse-transcribed. The *whiG* and *hrdB* cDNAs were amplified using specific primers named respectively G9/G10 and HrdB1/HrdB2 (Table 1). Each product was quantified during the PCR reaction by measuring the fluorescence emitted by the SYBR green. The amount of the *whiG* transcript in WT8 was fixed at one and the relative amount of *whiG* transcript in each mutant strain was then compared to that in WT8. As mentioned in the materials and methods section, the results were validated by assessing the efficiency of amplification of each gene using a calibration curve base of the Ct value of WT8 genomic DNA and by establishing the TM curve to check the specificity of each amplification reaction. Further, the amplification products obtained with the WT and the three Pig-pap mutants harboured a similar electrophoretic mobility and the sequence of the amplification product obtained with G9/G10 from the WT DNA corresponded to *S. ambifaciens whiG* (data not shown). Fig. 5 shows that the levels of *whiG* transcription for the three mutants were not significantly different from that of WT8.

The same experiments were conducted for the three exconjugants: pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) and pap3(*whiG*). The level of *whiG* transcription in the three exconjugants was approximately at least twice as high as the one of WT8. This is consistent with the presence of two copies of *whiG* (the resident copy and the transgene) in the three exconjugant strains.

We showed that, contrary to pap3, the introduction of *whiG* in pap1 and pap2 did not fully restore the WT phenotype since pap1(*whiG*) and pap2(*whiG*) produced a slightly grey pigmentation. However, such a difference cannot result from a differential expression of the transgene in these strains since the level of *whiG* transcription was similar in the three exconjugants.

In sum, we showed that the *whiG* gene is transcribed during all growth times tested and at a similar level in WT8 and in the three Pig-pap mutants after 48 h of growth. These results suggest that the genetic modification behind the Pig-pap mutant phenotype affects neither the gene sequence nor the transcription process but possibly the post-transcriptional regulation of *whiG*.

whiH is not transcribed in the Pig-pap mutants suggesting that σ^{WhiG} is not functional in these mutants

In *S. coelicolor* or in *S. aureofaciens*, the sigma factor σ^{WhiG} or σ^{RpoZ} regulates the transcription of the *whiH* gene [27,47]. As σ^{WhiG} of *S. ambifaciens* is highly similar to these sigma factors, we tested whether WhiG is functional in the three Pig-pap mutants by analysing the transcription of *whiH* in these mutants. Therefore the transcription of *whiH* in the Pig-pap mutants were tested by RT-PCR using RNAs obtained from 48 h plate-grown cultures of WT8, pap1, pap2 and pap3. This growth time was chosen since it was observed before that the level of *whiG* transcript was similar in the four strains at this time. Amplifications of *whiH* transcripts were realised using specific primers named H1/H2 (Table 1). Contrary to the WT strain, no *whiH*-specific transcript was detected in the three mutants (Fig. 6). As the introduction of *S. coelicolor whiH* in the Pig-pap mutants did not restore the WT phenotype, the simplest explanation of the absence of a *whiH* transcription in the mutants may be that the σ^{WhiG} is not active.

Characterisation of the papillae isolated from the grey exconjugant *pap3(whiG)*

The introduction of *whiG* in the strain *pap3* restored the capacity to generate white papillae. Ten exconjugant papillae deriving from independent mutational events were sub-cloned and named *pap3Gp1* to *pap3Gp10*. These mutants were white and did not sporulate after 14 days of growth on HT solid medium. To compare precisely the phenotype of these exconjugant papillae mutants with that of the strain *pap3*, one of them, *pap3Gp2*, was observed by SEM (Fig. 1 J). This mutant presented straight aerial hyphae without any spores and its phenotype was very similar to the Pig-pap mutant phenotype.

The presence of the plasmid *pSET152(whiG)* at the *attB* site of ϕ C31 in the genome of these mutants was checked by hybridising this recombinant plasmid on *Bam*HI-digested genomic DNAs. Five of the exconjugant papillae (*pap3Gp3*, *pap3Gp6*, *pap3Gp8*, *pap3Gp9* and *pap3Gp10*) lost the plasmid. The other five presented the plasmid containing *whiG*, integrated in the *attB* site of ϕ C31 (data not shown). In order to sequence the *whiG* transgene of the latter five mutants, the plasmid *pSET152(whiG)* was amplified by long range PCR (LR-PCR) using the primers C31.1/C31.2 (Table 1) matching the integration site. Then, the *whiG* transgene was amplified using three pairs of primers (G1/G2, G3/G4 and G5/G6) and sequenced. These experiments were done several times in order to discard the hypothesis of the generation of a mutation during the two PCR.

For the mutant *pap3Gp1*, a frameshift mutation corresponding to an addition of one cytosine at the position 924 of the *whiG* transgene sequence was detected and confirmed 3 times (Fig. 2). This mutation located in the region 4.1 led to the expression of a protein of 282 aminoacids with a C-terminal extremity of 46 aminoacids different from that of the *S. coelicolor* WhiG protein (Fig. 7). Thus, this mutation prevents the synthesis of a functional σ^{WhiG} since the region 4.2 required for the regulator role of WhiG and particularly for the recognition of the -35 box of the promoter is different.

For *pap3Gp2* and *pap3Gp4*, a frameshift mutation corresponding to the addition of one cytosine was located in a repeat sequence of 6 cytosines (at position 257-262, see Fig. 2). This frameshift mutation, confirmed five times for each strain, is located at the beginning of the

whiG ORF and led to the expression of a protein of 215 aminoacids without any obvious similarities with the WhiG protein of *S. coelicolor* (Fig. 7).

For pap3Gp5, a deletion of 16 nucleotides was detected between the nucleotide 783 and 798 of the transgene *whiG* sequence and confirmed three times (Fig. 2). This deletion located between the region 3 and 4 led to the creation of a stop codon at position 191 and implicated the expression of a protein truncated and no functional because of the absence of region 4 (Fig. 7).

For pap3Gp7, an addition of one guanosine at position 619 (Fig. 2) in the transgene *whiG* sequence was identified and confirmed two times. This mutation permits the expression of a protein of 215 aminoacids due to the presence of a stop codon at position 216 (Fig. 7). The comparison of its sequence to that of *S. coelicolor* WhiG shows that region 3 presents no obvious homology between the two sequences and region 4, notably region 4.2, is absent in the WhiG protein expressed by the *whiG* transgene in pap3Gp7 (Fig. 7).

Finally, except for the mutations described above, all of these five sequences were identical with that of *S. coelicolor whiG*. Such a result implies that no conversion event between the *S. coelicolor whiG* transgene and the *S. ambofaciens whiG* resident had occurred.

In sum, all of the exconjugant papillae tested (10/10) showed mutation in the *whiG* transgene via three different mechanisms, i.e. loss of plasmid, frameshift mutation or deletion in *whiG*. All of these mechanisms led to the absence of an active additional WhiG protein in the exconjugants and hence a return to the initial mutant phenotype. These results show that *whiG* integrated in the *attB* site of the mutant genome is a target of varied mutational events.

Discussion

Genetic instability has been widely described in the different *Streptomyces* species and in most cases, the mutants harbour large genome rearrangements located at the chromosomal extremities. Such mutants remain highly unstable since their progeny is frequently heterogeneous and additional rearrangement events frequently occur [53]. In *S. ambofaciens*, such a situation is observed in the case of the mutants deriving either from pigment-defective sectors or colonies [30]. The Pig-pap mutants probably resulting from a mutational event occurred during the aerial mycelium are quite different and represent a new class of mutants. Contrary to the Pig-col and Pig-sec mutants, they appear to be phenotypically similar and are devoid of large genome rearrangements, suggesting that they could result from a new mechanism of genetic instability and prompting us to characterise such a phenomenon. Analyses of the phenotype of the Pig-pap mutants pap1, pap2 and pap3 in SEM confirmed for the first time their phenotypic homogeneity, i.e. a typical WhiG-like phenotype. However, the introduction of *S. coelicolor whiG* in the three Pig-pap mutants yielded two distinct observations. In pap1 and pap2, the introduction of *S. coelicolor whiG* led to the production of a slightly grey pigmentation and of spores which seemed less septated and rounded than that of the WT strain. In pap3, the introduction of *S. coelicolor whiG* fully restored the WT phenotype. This difference cannot result from a differential expression of the transgene *S. coelicolor whiG* since quantitative RT-PCR revealed that it was expressed at a similar level in the three exconjugants pap1(*whiG*), pap2(*whiG*) and pap3(*whiG*). Therefore, our results suggest that in spite of the apparent phenotypic homogeneity observed among the Pig-pap mutants, a genotypic heterogeneity which does not consist of large deletion and/or amplification might exist.

Although the introduction of one copy of *S. coelicolor whiG* permitted the restoration of pigmentation and sporulation in the three mutants, *whiG* in these mutants was not mutated and its level of transcription was similar to that of the WT strain. Moreover, the complementation observed did not result from a very high overexpression of the transgene as in the case of ectopic sporulation, which has been observed after the introduction of a multicopy plasmid containing *whiG* into *S. coelicolor* [11,36]. Thus, in these Pig-pap mutants, a small increase of the level of *whiG* transcription permitted a change in the complex regulation cascade of the aerial mycelium differentiation implicating a delicate regulation of *whiG* in these mutants. These results led us to investigate whether the σ^{WhiG} factor was active

in the three Pig-pap mutants. Analyses of *whiH* transcription in the WT strain and in the Pig-pap mutants were performed because *S. ambofaciens* WhiG protein is highly identical to those of *S. coelicolor* and *S. aureofaciens*, suggesting that *S. ambofaciens* σ^{WhiG} also regulates the transcription of *whiH*. However, *whiH* was not transcribed in these mutants. Such an absence of transcription cannot result from a single mutation in *whiH* since the introduction of *whiH* did not restore the WT phenotype. Consequently, two hypotheses were formulated. First, the quantity of the WhiG protein is not sufficient in these mutants. Second, the σ^{WhiG} is sequestered. In both cases, the introduction of one copy of *whiG* seems to be sufficient to restore the regulation cascade of the sporulation process.

The first hypothesis implies that the genetic modification leading to the *whiG*-like phenotype in the Pig-pap mutants results either from a post-transcriptional modification taking place before the *whiG* translation, for example by an antisense RNA activity, or from an abnormal high proteolytic activity which leads to the degradation of the WhiG protein. This type of regulation has been well described for various alternative sigma factors and especially for the regulator of the general stress response sigmaS (RpoS) in *E. coli* [25,33] and for the *S. coelicolor* stress responsive SigH [52].

In the second hypothesis, the σ^{WhiG} may be sequestered by an unknown anti- σ factor either because of a mutation in the gene encoding this anti- σ factor or because of a mutation in the gene encoding the anti-anti- σ factor. In both cases, such a mutation would prevent the dissociation of the complex σ^{WhiG} and anti- σ^{WhiG} and the liberation of σ^{WhiG} . It must be underlined that the regulation of the σ^{WhiG} remains yet unknown since neither anti- σ^{WhiG} nor anti-anti- σ^{WhiG} has been identified in *S. coelicolor* or in other species. Although σ^{WhiG} is the homologue of σ^{FliA} in *S. typhimurium* whose activity is known to be regulated by an anti- σ^{FliA} named FlgM, no homologue of *flgM* has been discovered in the genome sequence of *S. coelicolor* [14,40]. In such a hypothesis, the complementation of Pig-pap phenotype by *whiG* could result from a gene dosage effect.

To test such hypotheses, we looked for the presence of the WhiG protein by using antibodies, gift by Pr. Keith Chater, and directed against two regions of the protein (residues 2-16 and residues 210-224). Such antibodies have been used to detect the WhiG protein in a crude extract of *E. coli* proteins [50]. Unfortunately, the WhiG protein was not detected in the

wild type WT8 and the three Pig-pap mutants (data not shown). Furthermore, at our knowledge there is no publication relative to the use of such antibodies in the detection and the quantification of the protein WhiG in *S. coelicolor*.

To our knowledge, no *whi* mutants isolated either by classic or insertional mutagenesis has permitted the identification of such a regulator. Considering the fact that the Pig-pap mutants harbour a stable phenotype and are devoid of large genome rearrangements, they constitute the first type of *whi* mutants which are generated at high frequency and which could be useful to elucidate the complex regulation of *whiG*.

Finally, the study of the exconjugant papillae isolated from the colonies of pap3(*whiG*) showed us that the *S. coelicolor whiG* transgene is a target of different genetic instability events leading either to the loss of the plasmid, to deletion in the transgene, or to frameshift mutation. It is interesting to note that all of these events seem to appear during a specific step of colony development, i.e. the aerial mycelium formation since the mutant phenotype appears only in the form of white papillae. It was reported that after 14 days of growth, more than 70 % of the colonies harboured white papillae in *S. ambofaciens* [34]. This characteristic is also observed in pap3(*whiG*) which contains an additional copy of *whiG*, which then further leads to the production of papillae. Such observations suggest that the arrest of the sporulation process in some parts of the mycelium appears unavoidable and raise the question about the role of these white papillae in *S. ambofaciens*.

Acknowledgments

We are grateful to Pr. Keith F. Chater for kindly providing the *whi* genes and the *S. coelicolor* strains. We would like to thank Luc Marshal for his technical assistance concerning the scanning electron microscopy. Many thanks are given to Terry Huang and Vincent Burrus for their helps in the english formulation of the manuscript. This work was supported by “Le Ministère de la Jeunesse de l’Education Nationale et de la Recherche”.

References

- [1] J.A. Aínsa, H.D. Parry, K.F. Chater, A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.* 34 (1999) 607-619.
- [2] J.A. Ainsa, N.J. Ryding, N. Hartley, K.C. Findlay, C.J. Bruton, K.F. Chater, WhiA, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.* 182 (2000) 5470-5478.
- [3] D.N. Arnosti, M.J. Chamberlin, Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 830-834.
- [4] R.H. Baltz, Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*, *Dev. Ind. Microbiol.* 21 (1980) 43-54.
- [5] M.J. Bibb, 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Microbiology* 142 (1996) 1335-1344.
- [6] M.J. Bibb, V. Molle, M.J. Buttner, σ^{BldN} an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.* 182 (2000) 4606-4616.
- [7] M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien, E.T. Seno, R.N. Rao, B.E. Schoner, Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp, *Gene* 116 (1992) 43-49.
- [8] R.R. Burgess, L. Anthony, How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 126-131.
- [9] S. Catakli, A. Andrieux, P. Leblond, B. Decaris, A. Dary, Spontaneous chromosome circularization and amplification of a new amplifiable unit of DNA belonging to the terminal inverted repeats in *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, *Arch. Microbiol.* 179 (2003) 387-393.

- [10] K.F. Chater, A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*, *J. Gen. Microbiol.* 72 (1972) 9-28.
- [11] K.F. Chater, C.J. Bruton, K.A. Plaskitt, M.J. Buttner, C. Méndez, J.D. Helmann, The developmental fate of *Streptomyces coelicolor* hyphae depends on a gene product homologous with the motility sigma factor of *Bacillus subtilis*, *Cell* 59 (1989) 133-143.
- [12] K.F. Chater, Genetics of differentiation in *Streptomyces*, *Annu. Rev. Microbiol.* 4 (1993) 685-713.
- [13] K.F. Chater, Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony, *Microbiology* 144 (1998) 1465-1478.
- [14] K.F. Chater, Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 667-673.
- [15] N.K. Davis, K.F. Chater, Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics, *Mol. Microbiol.* 4 (1990) 1679-1691.
- [16] P. Demuyter, P. Leblond, B. Decaris, J.M. Simonet, Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*, *J. Gen. Microbiol.* 134 (1988) 2001-2007.
- [17] W.J. Dower, J.F. Miller, C.W. Ragsdale, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 6127-6145.
- [18] M.A. Elliot, M.J. Bibb, M.J. Buttner, B.K. Leskiw, BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 257-269.
- [19] G. Fischer, B. Decaris, P. Leblond, Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4553-4558.

- [20] K. Flärdh, K.C. Findlay, K.F. Chater, Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Microbiology* 145 (1999) 2229-2243.
- [21] A.M. Gehring, J.R. Nodwell, S.M. Beverley, R. Losick, Genomewide insertional mutagenesis in *Streptomyces coelicolor* reveals additional genes involved in morphological differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9642-9647.
- [22] D.A. Hopwood, M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, H. Schrempf, Genetic manipulation of *Streptomyces* – a laboratory manual, The John Innes foundation, Norwich 1985.
- [23] G.H. Kelemen, G.L Brown, J. Kormanec, L. Potuckova, K.F. Chater, M.J. Buttner, 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.* 21 (1996) 593-603.
- [24] G.H. Kelemen, P. Brian, K. Flärdh, L. Chamberlin, K.F. Chater, M.J. Buttner, Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2515-2521.
- [25] E. Klauck, M. Lingnau, and R. Hengge-Aronis, Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 1381-1390.
- [26] J. Kormanec, L. Potuckova, B. Rezuchova, The *Streptomyces aureofaciens* homologue of the *whiG* gene encoding a putative sigma factor essential for sporulation, *Gene* 143 (1994) 101-103.
- [27] J. Kormanec, R. Novakova, D. Homerova, B. Sevcikova, The *Streptomyces aureofaciens* homologue of the sporulation gene *whiH* is dependent on *rpoZ*-encoded sigma factor, *Biochim. Biophys. Acta.* 1444 (1999) 80-84.

- [28] J. Kormanec, R. Novakova, D. Homerova, B. Rezuchova, *Streptomyces aureofaciens* sporulation specific sigma factor sigma(*rpoZ*) directs expression of a gene encoding protein similar to hydrolases involved in degradation of the lignin related biphenyl compounds, Res. Microbiol. 152 (2001) 883-888.
- [29] P. Leblond, P. Demuyter, L. Moutier, M. Laakel, B. Decaris, J.M. Simonet, Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*, J. Bacteriol. 171 (1989) 419-423.
- [30] P. Leblond, B. Decaris, New insights into the genetic instability of *Streptomyces*, FEMS Microbiol. Lett. 123 (1994) 225-232.
- [31] P. Leblond, G. Fischer, F.X. Francou, F. Berger, M. Guerineau, B. Decaris, The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA, Mol. Microbiol. 19 (1996) 261-271.
- [32] M. Lonetto, M. Gribskov, C.A. Gross, The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships, J. Bacteriol. 174 (1992) 3843-3849.
- [33] N. Majdalani, C. Cuning, D. Sledjeski, T. Elliott, S. Gottesman, DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 12462-12467.
- [34] P. Martin, A. Dary, B. Decaris, Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium *Streptomyces ambofaciens*: characterization of different mutator states, Mutat. Res. 421 (1998) 73-82.
- [35] P. Martin, A. Dary, A. Andre, G. Fischer, P. Leblond, B. Decaris, Intraclonal polymorphism in the bacterium *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877: evidence for a high degree of heterogeneity of the wild type clones, Mutat. Res. 430 (1999) 75-85.
- [36] C. Méndez, K.F. Chater, Cloning of *whiG*, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2), J. Bacteriol. 169 (1987) 5715-5720.

- [37] M.J. Merrick, A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*, J. Gen. Microbiol. 96 (1976) 299-315.
- [38] V. Molle, M.J. Buttner, Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages, Mol. Microbiol. 36 (2000) 1265-1278.
- [39] K. Ohnishi, K. Kutsukake, H. Suzuki, T. Lino, Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*, Mol. Gen. Genet. 221 (1990) 139-147.
- [40] K. Ohnishi, K. Kutsukake, H. Suzuki, T. Lino, A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigmaF, Mol. Microbiol. 6 (1992) 3149-3157.
- [41] S. Omura, H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, Y. Takahashi, H. Horikawa, H. Nakazawa, T. Osonoe, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* deducing the ability of producing secondary metabolites, Proc. Natl. Sci. USA 98 (2001) 12215-12250.
- [42] L. Potuckova, G.H. Kelemen, K.C. Findlay, M.A. Lonetto, M.J. Buttner, J. Kormanec, A new RNA polymerase sigma factor, σ_F , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp, Mol. Microbiol. 17 (1995) 37-48.
- [43] T.G. Pridham, P. Anderson, C. Foly, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesseltine, R.C. Benedict, A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*, Antibiotic Annual (1956-1957) 947-953.
- [44] K.M. Ririe, R.P. Rasmussen, C.T. Wittwer, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, Anal. Biochem. 245 (1997) 154-160.
- [45] R.G. Rutledge, C. Côté, Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 1-6.

- [46] N.J. Ryding, G.H. Kelemen, C.A. Whatling, K. Flärdh, M.J. Buttner, K.F. Chater, A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.* 29 (1998) 343-357.
- [47] N.J. Ryding, M.J. Bibb, V. Molle, K.C. Findlay, K.F. Chater, M.J. Buttner, New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.* 178 (1999) 6310-6318.
- [48] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [49] J. Soliveri, E. Vijgenboom, C. Granozzi, K.A. Plaskitt, K.F. Chater, Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes, *J. Gen. Microbiol.* 139 (1993) 2569-2578.
- [50] H. Tan, H. Yang, Y. Tian, W. Wu, C.A. Whatling, L.C. Chamberlin, M.J. Buttner, J. Nodwell, K.F. Chater, The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form a RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation, *Gene* 212 (1998) 137-146.
- [51] C.J. Thompson, D. Fink, L.D. Nguyen, Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence, *Genome Biol.* 3 (2002).
- [52] P.H. Viollier, A. Weihofen, M. Folcher, C.J. Thompson, Post-transcriptional regulation of the *Streptomyces coelicolor* stress responsive sigma factor, SigH, involves translational control, proteolytic processing, and an anti-sigma factor homolog, *J. Mol. Biol.* 325 (2003) 637-649.
- [53] J.N. Volff, J. Altenbuchner, Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome, *Mol. Microbiol.* 27 (1998) 239-246.

Legends

Table 1

Nucleotide sequence of oligonucleotide pairs used in this study. These sequences were deduced from the genome sequence of *S. coelicolor* available in the GeneBank database. The size of the PCR products (in bp) and the annealing temperature used for the reactions are indicated. For C31.1/C31.2, the PCR product size, corresponds to the size of the amplified region containing the *attB* site of Φ C31 without any integrated plasmid.

Table 2

Number and phenotype of the exconjugants obtained after introduction of pSET152, pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) and pSET152(*whiJ*) in the Pig-pap mutants (pap1, pap2 and pap3). The phenotype was observed after 14 days of growth on HT solid medium.

FIG. 1

SEM pictures of mycelial fragments of *S. ambofaciens* WT8 (A), the Pig-pap mutants (B: pap1; C: pap2; D: pap3), *S. coelicolor* M145 (E), the WhiG mutant C71 of *S. coelicolor* (F), the three exconjugants (G: pap1(*whiG*); H: pap2(*whiG*); I: pap3(*whiG*)) and the exconjugant papilla pap3Gp2 (J). Colonies were grown for 60 h on HT solid medium before being prepared for electron microscopy. Bars indicated in white on each picture corresponds to 1 μ m.

FIG. 2

S. ambofaciens whiG gene sequence and localisation of the oligonucleotides used to amplify the different portions of this gene (marked by arrows) (Table 1). The putatively deduced *whiG* ORF (in comparison with the data known for *S. coelicolor* [11]) is flanked by a dotted line. Also shown are the *whiG* promoter region (underlined by a mark upstream the ORF), the transcription start point (+1) taken from Kelemen et al., 1996, the potential ribosome-binding site (RBS?) and the putative terminator region (underlined by a mark downstream the ORF) taken from Chater et al., 1989 [11, 23]. The nucleotides which are different between the *whiG* sequence of *S. coelicolor* and that of *S. ambofaciens* are indicated below the *S. ambofaciens whiG* sequence (“-“ corresponds to the absence of the nucleotide).

FIG. 3

End-to-end alignment of WhiG of *S. ambofaciens* (*S. ambo*) with those of *S. coelicolor* (*S. coel*), *S. avermitilis* (*S. aver*), *S. griseocarum* (*S. gris*) and *S. aureofaciens* (*S. aure*). The alignment was made using the BioEdit software. Black boxes indicate residues shared by at least 3 of the 5 sequences. White boxes indicate residues which differ between the sequences. The regions conserved between the sigma factors belonging to the σ^{70} family are indicated by arrows. Regions 1 and 3, which exhibit lower conservation, are marked by dotted arrows.

FIG. 4

RT-PCR experiments to detect *whiG* transcript in *S. ambofaciens* WT8 (A) and its Pig-pap mutant derivative pap1 (B). RNA samples were isolated from surface cultures at 24 h (Lane 2), 36 h (Lane 3), 48 h (Lane 4), 72 h (Lane 5) and 96 h (Lane 6) grown on HT solid medium at 30°C. The different developmental stages are indicated by arrows (V: vegetative mycelium formation; A: aerial mycelium formation; S: sporulation). The RT-PCR reactions were done with the oligonucleotides G7/G8. Lambda DNA digested with *Pst*I was used as molecular weight marker (Lane 1).

FIG. 5

Comparison of *whiG* transcription using quantitative RT-PCR experiments and standardised RNA amounts for the WT strain of *S. ambofaciens* WT8 (Lane 1), the three Pig-pap mutants (Lane 2: pap1; Lane 3: pap2; Lane 4: pap3), the three exconjugants (Lane 5: pap1(*whiG*); Lane 6: pap2(*whiG*) and Lane 7: pap3(*whiG*)). RNA samples were isolated from surface cultures at 48 h of growth on HT solid medium at 30 °C. The experiments were done five times for pap1, three times for pap2, pap3 and pap3Gp2, two times for pap1(*whiG*) and pap3(*whiG*) and once for pap2(*whiG*) using independent RNA extractions. The average and the standard deviation (σ^{n-1}) are shown.

FIG. 6

RT-PCR experiments conducted to detect *recA* (A) and *whiH* (B) transcripts in *S. ambofaciens* WT8 (A and B: Lane 2) and the three Pig-pap mutants pap1 (A and B: Lane 3), pap2 (A and B: Lane 4) and pap3 (A and B: Lane 5). RNA samples were isolated from surface cultures at 48 h of growth on HT solid medium at 30 °C. Experiments were done two times with two independent RNA extractions. A: RT-PCR reactions were done with the

oligonucleotides Rec1/Rec2. B: RT-PCR reactions were done with the oligonucleotides H1/H2. *Pst*I-digested Lambda DNA digested with was used as molecular weight marker (Lane 1).

FIG. 7

End-to-end alignment of WhiG of *S. coelicolor* (*S. coel*) and the WhiG transgene of the exconjugant papillae pap3Gp1 (*Gp1*), pap3Gp2 (*Gp2*), pap3Gp4 (*Gp4*), pap3Gp5 (*Gp5*) and pap3Gp7 (*Gp7*). The alignment was made using the BioEdit software. Black boxes indicate residues shared by at least 3 of the 5 sequences. White boxes indicate residues which differ between the sequences. The asterisks correspond to stop codon. The regions conserved between the sigma factors belonging to the σ^{70} family are indicated by arrows. Regions 1 and 3, which exhibit lower conservation, are marked by dotted arrows.

Table 1

Primers	Sequence 5' to 3'	Annealing T(°C)	Product (bp)
G1 G2	CGAGTGATCACCCAGAGC TGATCTCCCGGTCGACGT	60	517
G3 G4	ACGCTCGACGAGCTGTGG GGCGGTGTCCTCCAGGGT	55	525
G5 G6	GTGGAGGACCTCCACGCG GCACGCTGCATCGACCGG	55	517
G7 G8	ACGCGATCGAGAAGTTCG CGAGCGACAGCTGACTGA	60	261
G9 G10	AGGCGGACTTCGTCTCCT GGGTGATCGCGTACGTCT	60	101
Rec1 Rec2	TCCTGTCCCAGCCGGACAA GTCGCACCGAGGCGTAGAA	60	280
HrdB1 HrdB2	AGGTGGCGTACGTGGAGAC CGCGGCATGCTCTTCT	60	110
C31.1 C31.2	GACGATGTAGGTCACGGTC TCGAGAACCCGCTGACGCT	50	200
H1 H2	AGGAGATCGGACAGCGTTT GATGTCAGGATCCAGCAGG	60	250

Table 2

pSET152 insert	Mutant strain		
	pap 1	pap2	pap3
none	>100 Pigment-defective No sporulation	>100 Pigment-defective No sporulation	>100 Pigment-defective No sporulation
<i>whiA</i>	13 Pigment-defective No sporulation	17 Pigment-defective No sporulation	10 Pigment-defective No sporulation
<i>whiB</i>	31 Pigment-defective No sporulation	18 Pigment-defective No sporulation	1 Pigment-defective No sporulation
<i>whiG</i>	65 Slightly pigmentation and sporulation	17 Slightly pigmentation and sporulation	8 Pigmentation, sporulation and white papillae formation
<i>whiH</i>	155 Pigment-defective No sporulation	121 Pigment-defective No sporulation	43 Pigment-defective No sporulation
<i>whiJ</i>	27 Pigment-defective No sporulation	40 Pigment-defective No sporulation	26 Pigment-defective No sporulation

FIG. 1

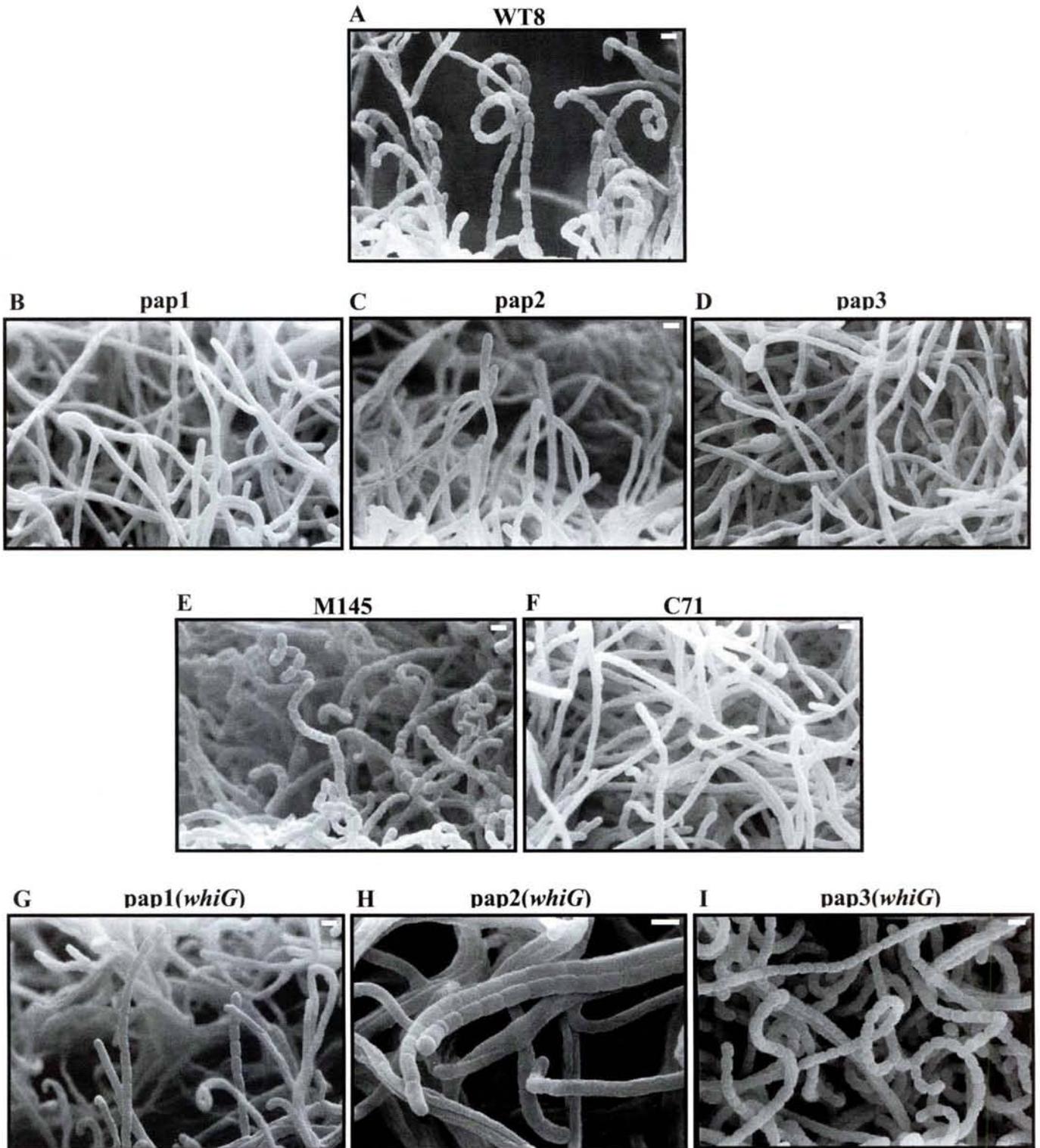


FIG. 2

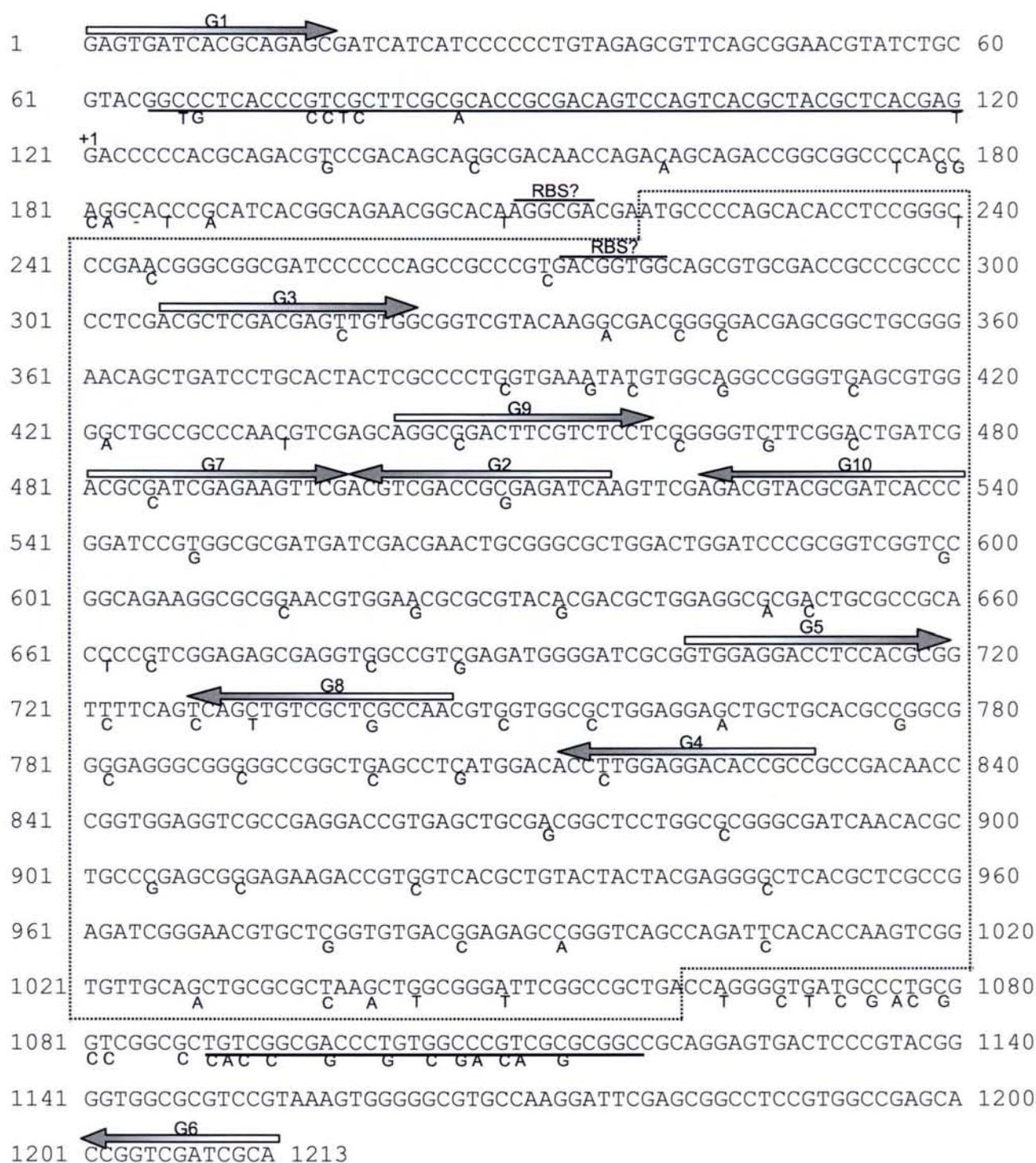


FIG. 3

	←----- 1 -----→				←----- 2.1 -----→		
<i>S. ambo</i>	MPQHTSGPER	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKA	TGDERLREQI	ILHYSPLVKY	60
<i>S. coel</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKT	TGDERLREQI	ILHYSPLVKY	60
<i>S. aver</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKA	TGDERLREQI	ILHYSPLVKY	60
<i>S. gris</i>	MPQHTSGSDR	AAAPPAAR--	GAARPPAPST	LDELWRSYKA	SGDERLREQI	ILHYSPLVKY	58
<i>S. aure</i>	MPQHTSGSDR	AAVPPAAR--	GSVRSTAPSS	LEVLWRSYKD	SGDERLREQI	ILHYSPLVKY	58
	←----- 2.2 -----→		←----- 2.3 -----→		←----- 2.4 -----→		
<i>S. ambo</i>	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120
<i>S. coel</i>	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120
<i>S. aver</i>	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDIGREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120
<i>S. gris</i>	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGTFGLIDAI	EKFDPARAIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	118
<i>S. aure</i>	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDIERSIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	118
	←----- 3 -----→						
<i>S. ambo</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYIT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180
<i>S. coel</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180
<i>S. aver</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPT	EGEVATEMGI	AVDELHSVFS	QLSLANVVAL	180
<i>S. gris</i>	DWIPRSVRQK	ARAVERAYAT	LEAELRRTPT	EAEVAAEMGI	ALEELHSVFS	QLSLANVVAL	178
<i>S. aure</i>	DWIPRSVRQK	ARAVERAYAT	LEAQLRRTPT	EGEVAGEMGI	GVEELHTVFS	QLSLANVVAL	178
					←----- 4.1 -----→		
<i>S. ambo</i>	EELLHAGGEG	GGRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRLI	LARAINTLPE	REKTVVTLYY	240
<i>S. coel</i>	EELLHAGGEG	GGRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRLI	LARAINTLPE	REKTVVTLYY	240
<i>S. aver</i>	EELLHVGGEG	GDRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRRF	LARAINTLPD	REKTVVTLYY	240
<i>S. gris</i>	EDLLHAGDEG	GERLSLMDTL	EDTAADDPVE	VAEDHELRLI	LARAINTLPE	REKTVVTLYY	238
<i>S. aure</i>	EELLHVGGEG	GDRLSLMDTL	EDHAADDPVE	VAEDRELRLI	LARAINTLPE	REKTVVTLYY	238
	←----- 4.2 -----→						
<i>S. ambo</i>	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLAGFGR			280
<i>S. coel</i>	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLAGFGR			280
<i>S. aver</i>	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLASFGR			280
<i>S. gris</i>	YEGTLAEIG	QVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLADVGR			278
<i>S. aure</i>	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLADVGR			278

FIG. 4

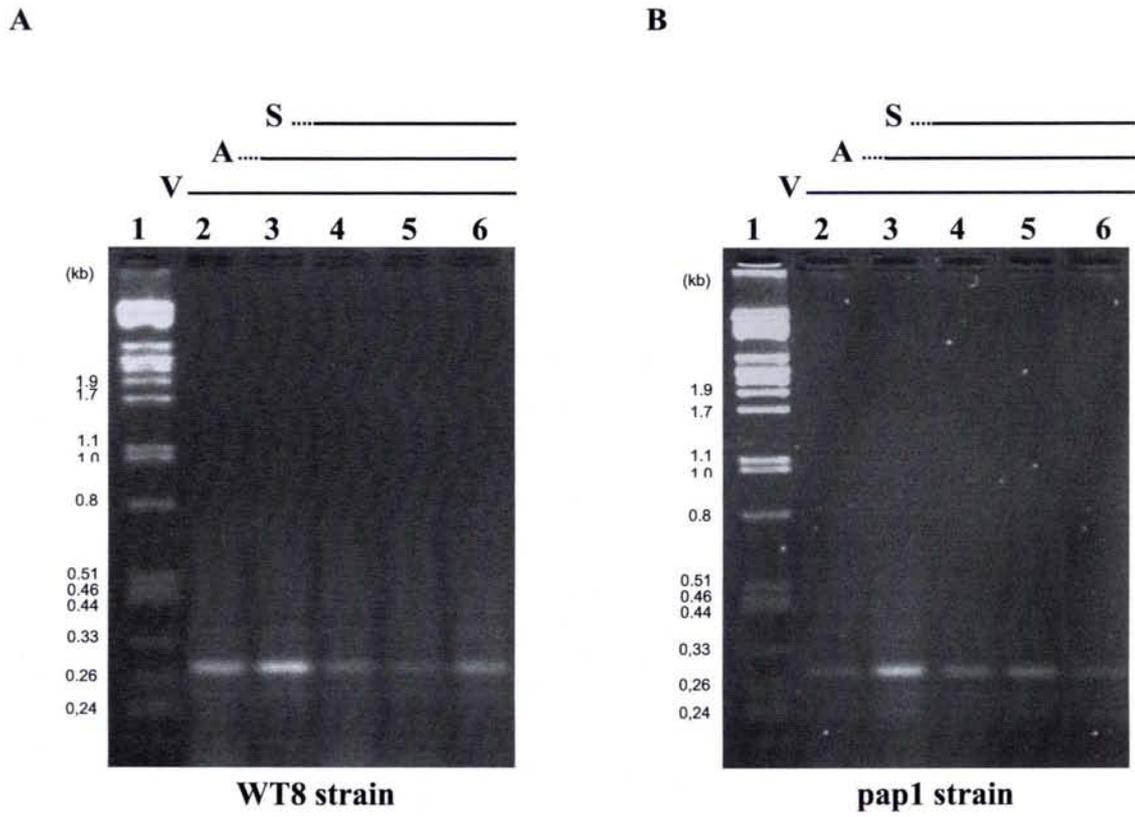


FIG. 5

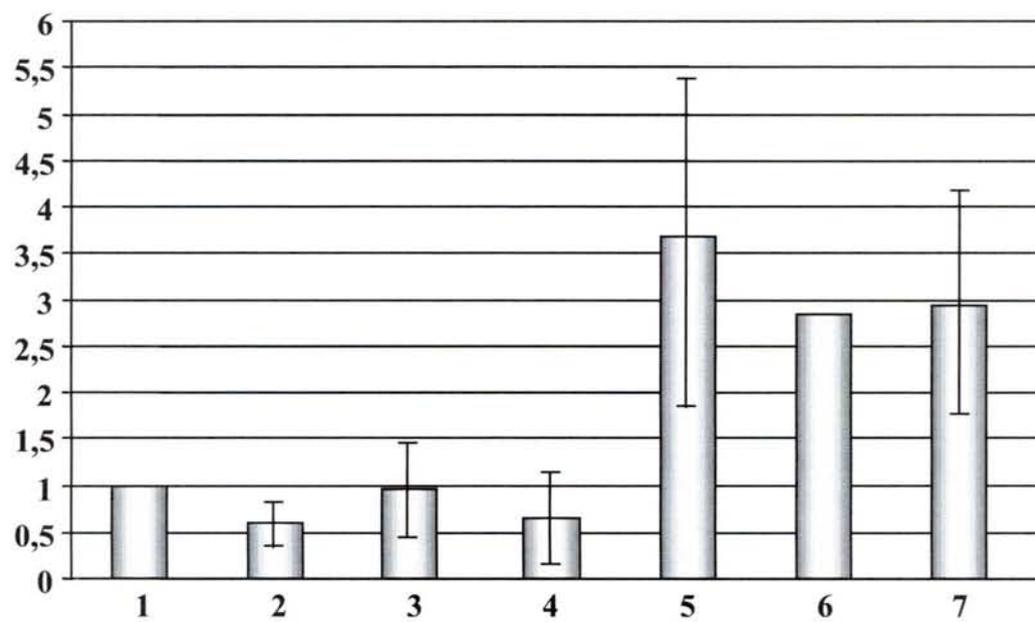


FIG. 6

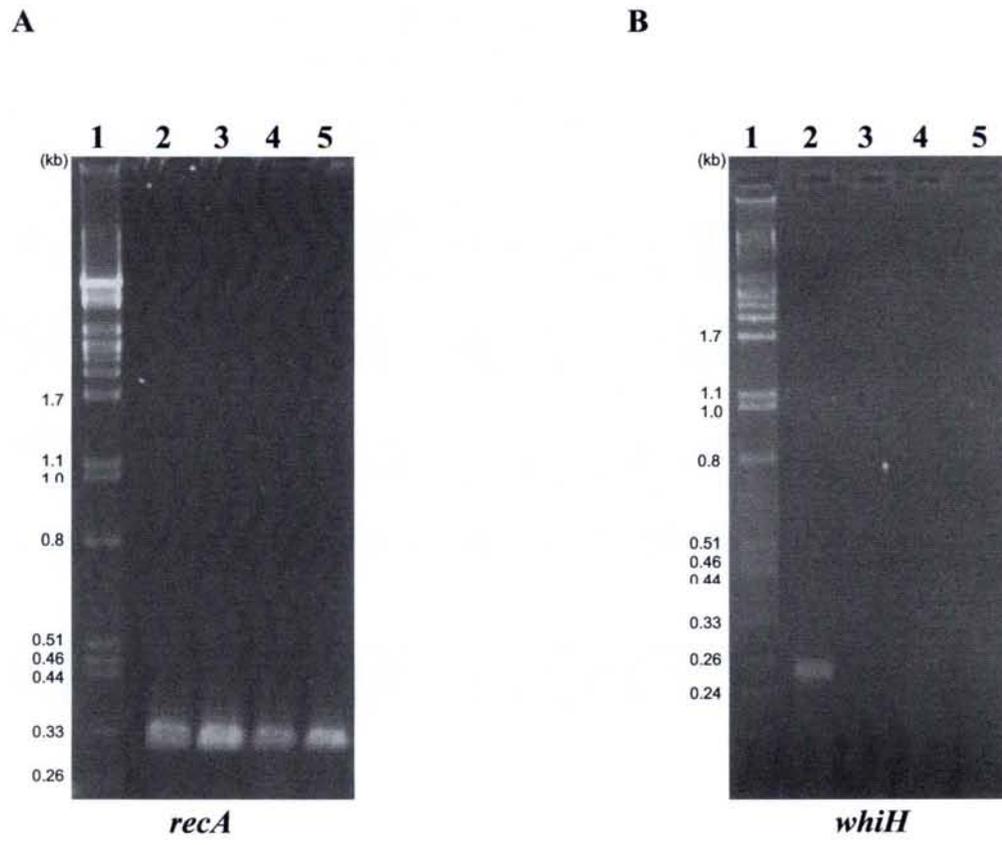
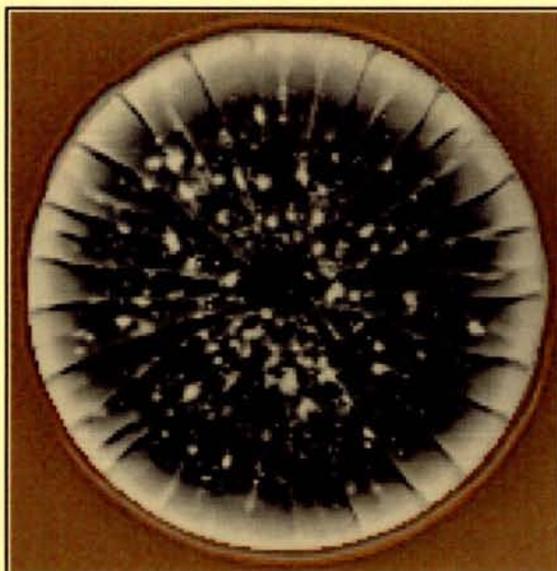


FIG. 7

		←----- 1 -----→				←----- 2.1 -----→		
<i>S. coel</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKT	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60	
<i>Gp1</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKT	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60	
<i>Gp2/Gp4</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPSRPRR	WQRATARPLD	ARRAVAVVQD	DRRRAAAGTA	DPALLAPREV	60	
<i>Gp5</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKT	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60	
<i>Gp7</i>	MPQHTSGSDR	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKT	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60	
		←----- 2.2 -----→		←----- 2.3 -----→		←----- 2.4 -----→		
<i>S. coel</i>	VAGRVSGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120	
<i>Gp1</i>	VAGRVSGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120	
<i>Gp2/Gp4</i>	RGGPGQRGTA	AQCRAGRRLR	LRGVRPDRRH	REVRRRPGDQ	VRDVRDHPDP	GRDDRRTAGA	120	
<i>Gp5</i>	VAGRVSGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120	
<i>Gp7</i>	VAGRVSGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120	
		←----- 3 -----→						
<i>S. coel</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180	
<i>Gp1</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180	
<i>Gp2/Gp4</i>	GLDPAVGAAE	GAQRGARVRD	AGGTPAPHSL	GERGRRGDGD	RGGGPPRGLQ	PVVAGQRRGP	180	
<i>Gp5</i>	DWIPRSVRQK	ARNVERAYAT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180	
<i>Gp7</i>	DWIPRSVRQK	ARNGGARVRD	AGGTPAPHSL	GERGRRGDGD	RAGGPPRGLQ	PVVAGQRRGP	180	
		←----- 4.1 -----→						
<i>S. coel</i>	EELLHAGGEG	GGRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRLR	LARAINTLPE	REKTVVTLYY	240	
<i>Gp1</i>	EELLHAGGEG	GGRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRLR	LARAINTLPE	REKTVRHAVL	240	
<i>Gp2/Gp4</i>	GGTAARGRRG	RRPAQPDGHP	GGHRRRQPGG	GRRGP*			215	
<i>Gp5</i>	EELLHAGGSA	*					190	
<i>Gp7</i>	GGTAARGRRG	RRPAQPDGHP	GGHRRRQPGG	GRRGP*			215	
		←----- 4.2 -----→						
<i>S. coel</i>	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLAGFGR	*	280		
<i>Gp1</i>	LRGPHARRDR	ERAGCDREQG	QDPHQVGVA	TARQTCGFRP	LT*	282		
<i>Gp2/Gp4</i>						215		
<i>Gp5</i>						190		
<i>Gp7</i>						215		

3. Modulation de la production de mutants Pig-pap

par la réponse stringente



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

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 13.5 million (13.5% of the population).

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for the 21st century in the White Paper on *Ageing Better: The Government's Strategy for Older People* (Department of Health, 1999). This strategy is based on the following principles:

- Older people should be able to live independently and actively in their own homes.
- Older people should be able to live in their own communities.
- Older people should be able to live in their own homes and communities for as long as possible.

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for the 21st century in the White Paper on *Ageing Better: The Government's Strategy for Older People* (Department of Health, 1999). This strategy is based on the following principles:

- Older people should be able to live independently and actively in their own homes.
- Older people should be able to live in their own communities.
- Older people should be able to live in their own homes and communities for as long as possible.

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for the 21st century in the White Paper on *Ageing Better: The Government's Strategy for Older People* (Department of Health, 1999). This strategy is based on the following principles:

- Older people should be able to live independently and actively in their own homes.
- Older people should be able to live in their own communities.
- Older people should be able to live in their own homes and communities for as long as possible.

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for the 21st century in the White Paper on *Ageing Better: The Government's Strategy for Older People* (Department of Health, 1999). This strategy is based on the following principles:

- Older people should be able to live independently and actively in their own homes.
- Older people should be able to live in their own communities.
- Older people should be able to live in their own homes and communities for as long as possible.

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for the 21st century in the White Paper on *Ageing Better: The Government's Strategy for Older People* (Department of Health, 1999). This strategy is based on the following principles:

- Older people should be able to live independently and actively in their own homes.
- Older people should be able to live in their own communities.
- Older people should be able to live in their own homes and communities for as long as possible.

3. Modulation de la production de mutants Pig-pap par la réponse stringente

Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire et notamment par Jean-Nicolas Volff dans le cadre de sa thèse (Volff, 1994) indiquaient que la réponse stringente, déclenchée par une carence en acides aminés, pouvait être impliquée dans la production de mutants Pig-pap et ainsi constituer un des modulateurs de l'instabilité génétique chez *S. ambofaciens*. Cette hypothèse s'appuyait sur l'observation du phénotype des colonies et sur la distribution du nombre de papilles par colonie sur milieu carencé. Il avait été observé que *S. ambofaciens* ATCC23877 produisait un plus grand nombre de papilles sur milieu minimum glucosé (milieu MMG) que sur milieu complet HT. Lorsque le milieu MMG était complété en hydrolysate de caséine, le nombre de papilles diminuait fortement. Ainsi, ce résultat suggérait que la carence en nutriments modulait la production de papilles blanches sur les colonies, donc la production de mutants Pig-pap. Des expériences ont donc été réalisées dans le but de préciser le facteur nutritif responsable de la modulation de l'instabilité génétique d'une part et d'autre part de tester l'hypothèse d'une relation entre la réponse stringente et l'arrêt à haute fréquence du processus de sporulation dans certaines portions du mycélium d'une colonie de *Streptomyces*.

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec Magali Genay dans le cadre de son DEA (Genay, 2003) et de sa première année de thèse au laboratoire.

3.1. Recherche d'éléments nutritifs influençant la production de papilles blanches

La croissance de *S. ambofaciens* étant très lente sur milieu MMG, nous avons étudié l'influence de la variation de la quantité de nutriments sur la formation de papilles des souches sauvages *S. ambofaciens* WT8 et *S. coelicolor* M145 en les cultivant sur différents milieux carencés dérivant du milieu HT. Ces milieux renferment les mêmes composés que le milieu HT mais à des concentrations différentes. La composition du milieu HT et des différents milieux testés est présentée dans le tableau 4.

	Milieu HT	Milieu HTC1	Milieu HTC3	Milieu HTC4	Milieu HTC5	Milieu HTC6	Milieu HTC7	Milieu HTC8	Milieu HTC9	Milieu HTC10
Extrait de levure (DIFCO)	1 g/l	0,25g/l	0,25g/l	1 g/l	0,25g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Extrait de bœuf (DIFCO)	1 g/l	0,25g/l	0,25g/l	0,25g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Dextrine blanche (PROLABO)	10g/l	2,5g/l	2,5g/l	2,5g/l	2,5g/l	2,5g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l
Bacto-tryptone (Becton Dickinson)	2 g/l	0,5g/l	2 g/l	0,5g/l	0,5g/l	2 g/l	0 g/l	4 g/l	6 g/l	8 g/l
CoCl ₂ (Merck)	20mg/l	5mg/l	5mg/l	5mg/l	5mg/l	20mg/l	20mg/l	20mg/l	20mg/l	20mg/l
pH	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3
Bacto agar (Becton Dickinson)	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l

Tableau 4 :

Composition du milieu HT et de ses dérivés HTC (pour HT « Carencé »). De l'eau ultra pure a été utilisée pour la fabrication de ces milieux. Les concentrations indiquées en caractères gras sont celles qui diffèrent de celles présentes dans le milieu HT.

Après 14 jours de croissance à 30°C, le diamètre des colonies est similaire sur les différents milieux, ce qui permet la comparaison des différents phénotypes. Les distributions du nombre de papilles par colonie (npc) ont alors été établies après observation de trente colonies sélectionnées aléatoirement. Pour chaque milieu, les distributions du npc, pour les deux espèces, sont présentées dans les figures 28 pour *S. ambofaciens* et 29 pour *S. coelicolor*. Sur ces figures ne sont pas représentées les distributions observées sur les milieux HTC9 et HTC10 car aucune papille n'a été observée après 14 jours de croissance.

Il a été observé que sur le milieu HT, le npc variait de 0 à 25 pour *S. ambofaciens* et de 0 à 40 pour *S. coelicolor* (seule une colonie présentait un grand nombre de papilles) (figures 28 I. et 29 I.) alors que pour le milieu HTC1, dans lequel les concentrations en extrait de levure, extrait de bœuf, dextrine blanche et bacto-tryptone ont été divisées par quatre par rapport à celle du milieu HT, la majorité des colonies présentaient un très grand nombre de papilles (>50) (figures 28 II. et 29 II.). Ainsi, le nombre de papilles observées à la surface des

colonies augmente significativement lorsque ces deux souches sont cultivées sur un milieu où les nutriments sont en quantité limitée.

Lorsque l'extrait de levure (milieu HTC4) ou l'extrait de bœuf (milieu HTC5) est ajouté dans le milieu HTC1, à la même concentration que dans le milieu HT, les colonies présentaient majoritairement un très grand nombre de papilles (figures 28 IV et V et 29 IV et V). Comme pour le milieu HTC1, ces distributions diffèrent également de celles obtenues sur milieu HT. Les colonies cultivées sur milieu HTC3, dérivant du milieu HTC1 et dans lequel la concentration en bacto-tryptone est identique à celle du milieu HT, présentaient, par contre, un faible nombre de papilles compris entre 0 et 25 pour *S. ambofaciens* et 0 et 40 pour *S. coelicolor* (figures 28 III. et 29 III.). Ainsi, la variation de concentration en bacto-tryptone influencerait la formation de papilles blanches à la surface des colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

Afin de confirmer cette hypothèse, le milieu HTC7 qui dérive du milieu HT par l'absence de bacto-tryptone a été élaboré. Sur ce milieu, les colonies des deux souches présentaient un très grand nombre de papilles (figures 28 VII. et 29 VII.). Sur le milieu HTC8 dans lequel la concentration en bacto-tryptone a été doublée, les colonies présentaient très peu de papilles pour *S. ambofaciens* (figures 28 VIII. et 29 VIII.). Pour *S. coelicolor* cultivée sur milieu HTC8, des colonies à grand nombre de papilles sont observées. Cependant, ces papilles étaient très petites par rapport à celles produites par des colonies cultivées sur milieu HT. Les colonies cultivées sur les milieux HTC9 et HTC10 qui comportent une concentration très importante en bacto-tryptone (respectivement 3 fois et 4 fois plus) ne présentaient aucune papille. Ainsi, la quantité de bacto-tryptone dans le milieu a une forte influence sur la production de papilles blanches à la surface des colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

Enfin, pour le milieu HTC6 qui dérive du milieu HT par une limitation en dextrine blanche, les colonies présentaient un phénotype similaire à celui observé sur milieu HT (figures 28 VI. et 29 VI.). Ainsi, la réduction de la concentration en dextrine blanche ne semble pas influencer la production de papilles.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que la concentration en bacto-tryptone est le facteur influençant le plus fortement le npc donc la production de mutants Pig-pap sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

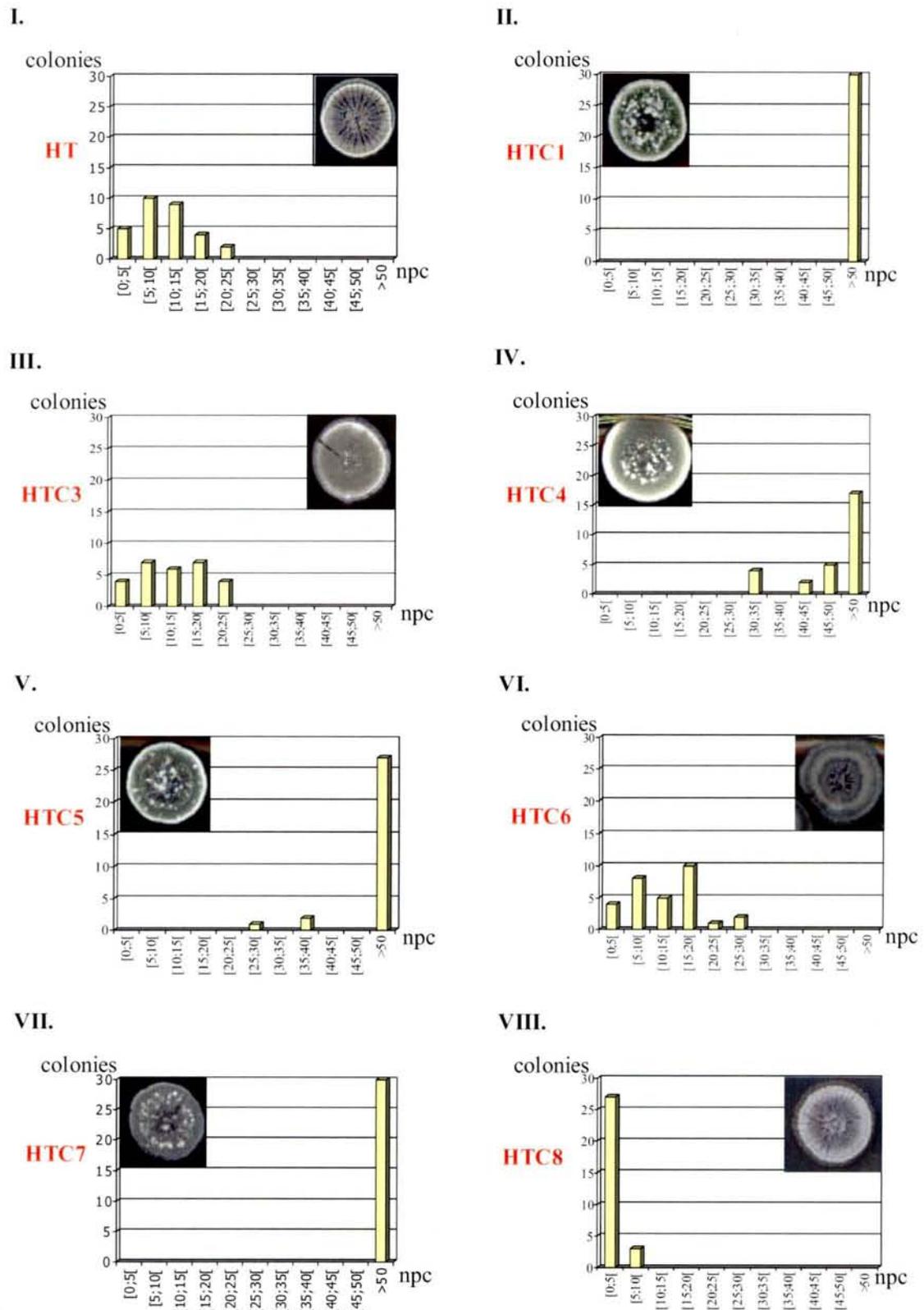


Figure 28 :

Représentation graphique de la distribution du nombre de papilles par colonie (npc) établie chez *S. ambifaciens* WT8. Trente colonies ont été observées après 14 jours de croissance à 30°C sur milieu HT (I.), HTC1 (II.), HTC3 (III.), HTC4 (IV.), HTC5 (V.), HTC6 (VI.), HTC7 (VII.) et HTC8 (VIII.). Les valeurs du npc ont été regroupées par classe de cinq et le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée. Pour chacune de ces distributions, une photographie de colonie correspondant au phénotype le plus représenté est présentée. A 14 jours de croissance, les colonies présentent un diamètre d'environ 2 cm.

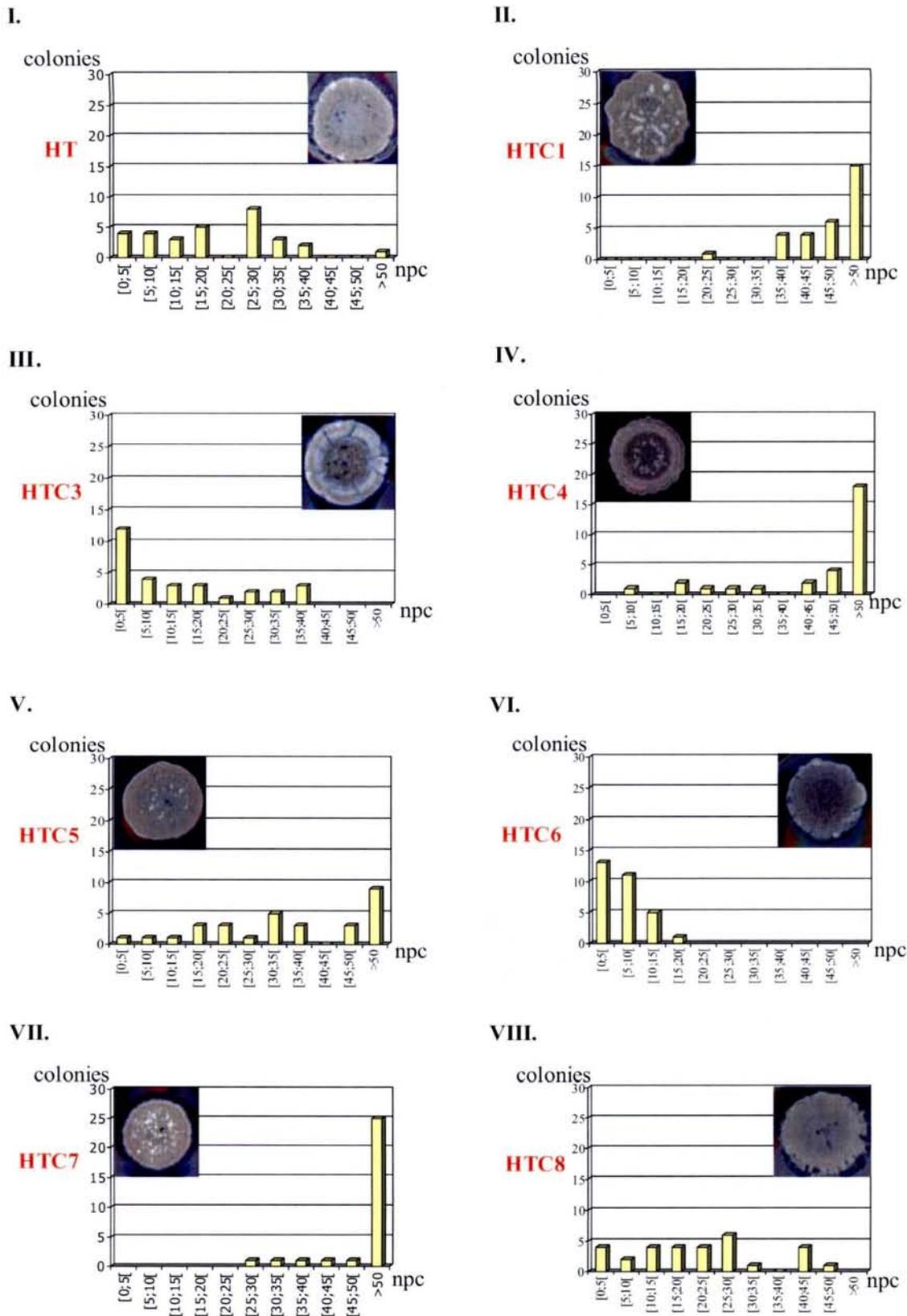


Figure 29 :

Représentation graphique de la distribution du nombre de papilles par colonie (npc) établie chez *S. coelicolor* M145. Trente colonies ont été observées après 14 jours de croissance à 30°C sur milieu HT (I.), HTC1 (II.), HTC3 (III.), HTC4 (IV.), HTC5 (V.), HTC6 (VI.), HTC7 (VII.) et HTC8 (VIII.). Les valeurs du npc ont été regroupées par classe de cinq et le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée. Pour chacune de ces distributions, une photographie de colonie correspondant au phénotype le plus représenté est présentée. A 14 jours de croissance, les colonies présentent un diamètre d'environ 2 cm.

La bacto-tryptone étant essentiellement composée d'acides aminés, les observations réalisées suggèrent que la carence en acides aminés pourrait être responsable de l'induction de la production de papilles blanches sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. Pour tester cette hypothèse, les 18 acides aminés (Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val) présents dans la bacto-tryptone ont été rajoutés dans le milieu HTC7, milieu qui diffère du milieu HT uniquement par l'absence de bacto-tryptone (tableau 4). La quantité de chaque acide aminé ajouté a été calculée afin d'obtenir pour chacun des acides aminés une concentration finale identique à celle du milieu HT. L'influence potentielle des deux acides aminés absents dans la bacto-tryptone (Asn et Gln) n'a pas été testée.

Pour les deux espèces, les distributions du npc ont été établies (figure 30). Pour chaque espèce, l'ajout des acides aminés dans le milieu HTC7 a permis de retrouver une distribution similaire à celle observée pour le milieu HT (figures 30 et 28 I. et 29 I.). Ainsi, ces résultats montrent qu'une carence en acides aminés influence fortement la fréquence de papilles produites sur la colonie.

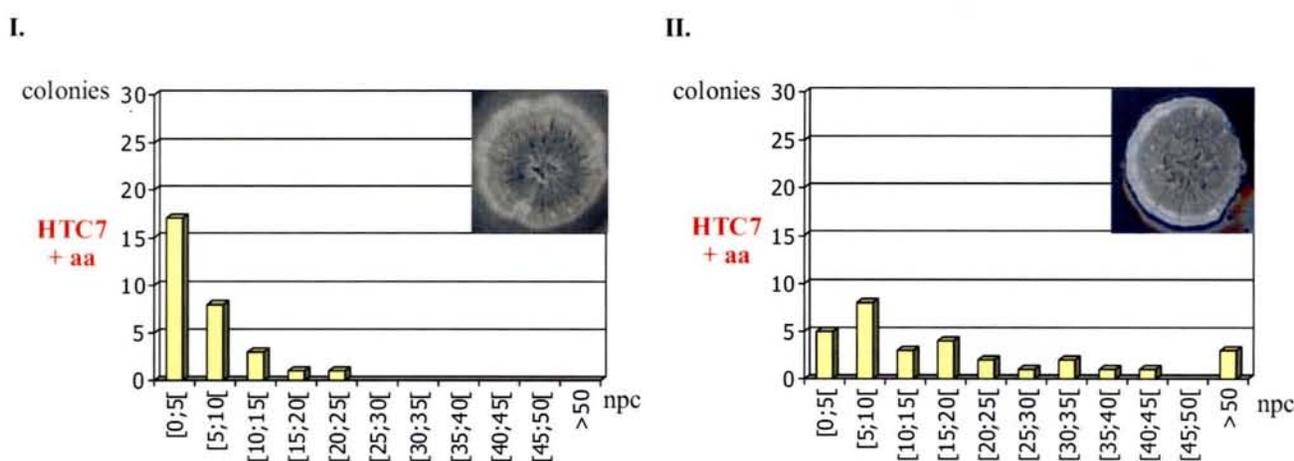


Figure 30 : Représentation graphique de la distribution du nombre de papilles par colonie (npc) établie chez *S. ambofaciens* WT8 (I.) et chez *S. coelicolor* M145 (II.). Trente colonies ont été observées après 14 jours de croissance à 30°C sur milieu HTC7 dans lequel les 18 acides aminés présents normalement dans la bacto-tryptone ont été rajoutés (HTC7 + aa). Les valeurs du npc ont été regroupées par classe de cinq et le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée. Pour chacune de ces distributions, une photographie de colonie correspondant au phénotype le plus représenté est présentée.

3.2. Caractérisation phénotypique et moléculaire de mutants Pig-pap issus de milieux « carencés »

Cinq papilles issues des colonies cultivées sur milieux carencés en bacto-tryptone ont été isolées. Ces papilles issues d'événements mutationnels indépendants ont été repiquées et sous-clonées jusqu'à l'obtention d'une population avec un phénotype homogène. Le mutant cp4 est issu d'une papille isolée sur une colonie de la souche sauvage M145 de *S. coelicolor* cultivée sur milieu HTC1. Les mutants WT8pap1 et WT8pap4 sont issus de papilles isolées sur une colonie de la souche sauvage WT8 de *S. ambofaciens* cultivée respectivement sur milieux HTC1 et HTC4. Enfin, les mutants WT12pap5 et WT12pap7 sont issus de papilles isolées sur une colonie de la souche sauvage WT12 de *S. ambofaciens* cultivée respectivement sur milieux HTC5 et HTC7. Ces mutants ont été caractérisés d'un point de vue phénotypique et moléculaire.

Comme les mutants Pig-pap issus de milieu HT et caractérisés antérieurement, ces cinq mutants présentent les caractéristiques suivantes :

- ❖ Ils sont dépigmentés.

- ❖ Ils ne sporulent pas.

En effet, après observation de fragments de colonies, après coloration de Gram, des cinq souches mutantes en microscope photonique, aucune spore n'a été détectée pour chaque préparation.

- ❖ Ils ne présentent pas de grand réarrangement génomique de type amplification et/ou délétion.

En effet, l'analyse de profils de restriction *Bam*HI, pour vérifier l'absence d'amplification, et des profils de macrorestriction *Ase*I obtenus en PFGE, pour vérifier l'absence de délétion, de l'ADN génomique des cinq souches mutantes testées a montré que ces profils étaient identiques aux profils de type sauvage. Ainsi, ces mutants ne présentent aucun réarrangement chromosomique de grande taille détectable par ce type d'analyse.

- ❖ Ils sont complémentables par introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor*.

En effet, le plasmide pSET152 et le plasmide pSET152(*whiG*) ont été introduits de façon indépendante dans chacun des cinq mutants par conjugaison avec le même protocole utilisé pour introduire ces plasmides dans les mutants Pig-pap issus de milieu HT. L'intégration de chaque plasmide a été vérifiée par hybridation de chacun des plasmides sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des transconjugants obtenus. L'intégration de pSET152 seul n'a pas permis la restauration du phénotype sauvage alors que les transconjugants obtenus après introduction et intégration de pSET152(*whiG*) pigmentaient, sporulaient et produisaient à nouveau des papilles blanches.

❖ Le transgène *whiG* est une cible mutationnelle.

Huit papilles isolées sur différentes colonies des transconjugants WT8pap1(*whiG*), WT8pap4(*whiG*), WT12pap5(*whiG*) et WT12pap7(*whiG*), deux pour chacun, ont été repiquées et sous-clonées sur milieu de culture sans pression de sélection (article n°2). Les huit mutants ainsi obtenus sont issus d'événements mutationnels indépendants. La présence du plasmide pSET152(*whiG*) intégré au niveau du site *attB* du phage ϕ C31 a été recherchée par analyse de profils d'hybridation entre ce plasmide et des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique des huit mutants. Pour ces mutants, six ne présentaient plus le plasmide intégré dans leur génome. Pour les deux autres mutants, un issu de WT12pap5(*whiG*) et un issu de WT12pap7(*whiG*), le transgène *whiG* a été séquencé suivant le protocole décrit dans la deuxième partie des résultats. Dans les deux cas, une mutation frameshift, correspondant à l'addition d'une cytosine au niveau d'une séquence constituée d'une répétition de six cytosines située entre les nucléotides 257 et 262 du gène *whiG* (figure 2 de l'article n°2), a été détectée. Ce type de mutation avait été détecté lors de l'analyse de la séquence du transgène *whiG* pour les mutants pap3Gp2 et pap3Gp4 issus de papilles repiquées sur le transconjugant pap3(*whiG*). Cette mutation conduit à l'expression d'une protéine tronquée, déletée de la région 4 indispensable pour la reconnaissance de la boîte -35 des promoteurs reconnus par σ^{WhiG} . Dans ce type de mutants, ce facteur σ n'est pas fonctionnel. Ainsi, ces résultats confirment la mutabilité à haute fréquence du transgène *whiG*.

Pour ces caractéristiques, les mutants dépigmentés et non sporulants obtenus sur milieux carencés en bacto-tryptone sont similaires aux mutants Pig-pap isolés sur milieu HT. La copie résidente du gène *whiG* des mutants cp4, WT8pap1 et une partie du gène de WT12pap5 ont été séquencées. Pour le mutant cp4, aucune mutation n'a été détectée pour les 1213 nucléotides du gène *whiG* lus après séquençage. Pour le mutant WT8pap1, une mutation

frameshift correspondant à la délétion d'une guanosine au niveau d'une séquence constituée d'une répétition de cinq guanosines située entre les nucléotides 789 et 793 du gène *whiG* a été observée (figure 2 de l'article n°2). Cette mutation génère un codon stop à la position 194 de la séquence en acides aminés et la protéine ne présente pas la région 4 du facteur sigma, indiquant que ce facteur n'est pas fonctionnel chez ce mutant (figure 31 et figure 7 de l'article n°2). Pour le mutant WT12pap5, une région du gène *whiG* allant des nucléotides 344 à 719 a été séquencée, ce qui a permis de détecter une délétion d'une guanosine à la position 687 (figure 2 de l'article n°2). Le reste du gène est en cours de séquençage. Ces résultats suggèrent que le phénotype Pig-pap pourrait résulter de mécanismes mutationnels différents, un affectant directement la séquence du gène *whiG* et l'autre la régulation post-transcriptionnelle de ce gène. Pour les trois autres mutants issus de papilles obtenues sur milieux carencés, le gène *whiG* est en cours de séquençage.

<i>WT8</i>	1	MPQHTSGPER	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKA	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60
<i>WT8pap1</i>	1	MPQHTSGPER	AAIPPAARDG	GSVRPPAPST	LDELWRSYKA	TGDERLREQL	ILHYSPLVKY	60
<i>WT8</i>	61	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120
<i>WT8pap1</i>	61	VAGRVSVGLP	PNVEQADFVS	SGVFGLIDAI	EKFDVDREIK	FETYAITRIR	GAMIDELRAL	120
<i>WT8</i>	121	DWIPRSVRQK	ARNVERAYTT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180
<i>WT8pap1</i>	121	DWIPRSVRQK	ARNVERAYTT	LEARLRRTPS	ESEVAVEMGI	AVEDLHAVFS	QLSLANVVAL	180
<i>WT8</i>	181	EELLHAGGEG	GGRLSLMDTL	EDTAADNPVE	VAEDRELRLR	LARAINLPE	REKTVVTLYY	240
<i>WT8pap1</i>	181	EELLHAGGEG	GAG*					193
<i>WT8</i>	241	YEGTLAEIG	NVLGVTESRV	SQIHTKSVLQ	LRAKLAGFGR			280
<i>WT8pap1</i>								

Figure 31 :

Alignement de séquences de la protéine WhiG de la souche sauvage *S. ambofaciens* WT8 et du mutant WT8pap1 issu d'une papille obtenue après croissance sur milieu HTC1. Cet alignement a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit. Les blocs noirs correspondent aux résidus identiques entre les deux séquences. L'astérisque indique le codon stop.

3.3. Etude du mutant *relA* de *S. coelicolor*

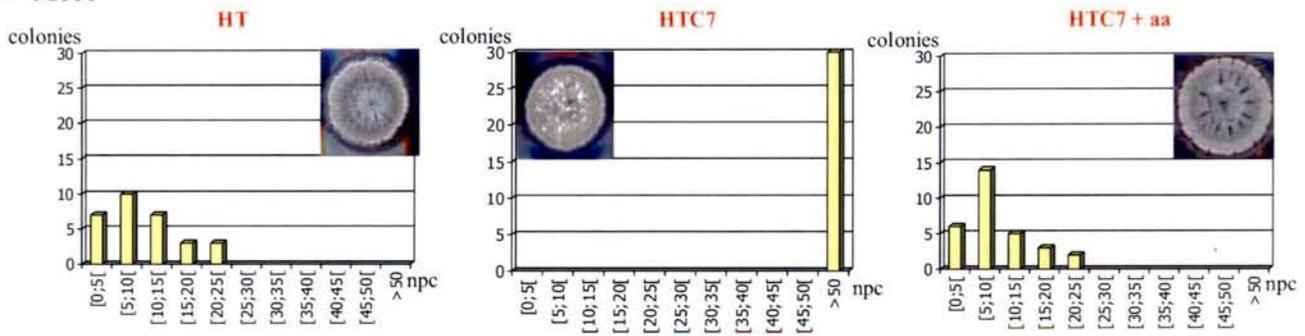
Chez *E. coli*, la réponse stringente se déclenche lorsque la concentration en acides aminés diminue dans le milieu, ce qui conduit à l'augmentation de la quantité en ARNt non chargés dans la cellule. L'expression protéique est alors stoppée et les ARNt non chargés qui se fixent sur le ribosome activent le gène *relA* codant la ppGpp synthétase. Le ppGpp ainsi produit se fixe sur l'ARN polymérase. Il peut réguler l'expression génique négativement ou positivement et elle intervient dans la compétitivité des facteurs σ (voir introduction).

Chez *Streptomyces*, des colonies à grand nombre de papilles sont observées lors d'une carence en acides aminés, ce qui suggère qu'il existerait une relation entre la réponse stringente et l'apparition de colonies à grand nombre de papilles. Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'inactivation du gène *relA* sur la production de papilles et d'observer le phénotype des colonies. En effet, si *relA* est muté, le ppGpp n'est plus produit et s'il existe une relation avec la production de papilles, des colonies à faible nombre de papilles seront observées.

Pour ce travail, nous avons étudié le mutant *relA* M570 de *S. coelicolor* qui a été construit par Chakraborty et Bibb (Chakraborty & Bibb, 1997). Ce mutant dérive de la souche sauvage M600 de *S. coelicolor* dans laquelle une partie du gène *relA* qui porte l'activité ppGpp synthétase a été remplacée par une cassette de résistance à l'hygromycine. Cette cassette remplace les nucléotides 501 à 2049 de la région codante de *relA* comportant 2541 nucléotides.

Des distributions du npc ont été établies sur milieux HT, HTC7 et HTC7 complété par les 18 acides aminés d'une part pour le mutant *relA* M570 et d'autre part pour la souche sauvage *S. coelicolor* M600, afin de vérifier si le phénomène décrit chez *S. ambofaciens* et chez la souche *S. coelicolor* M145 existe également pour la souche M600 (figure 32).

I. M600



II. M570

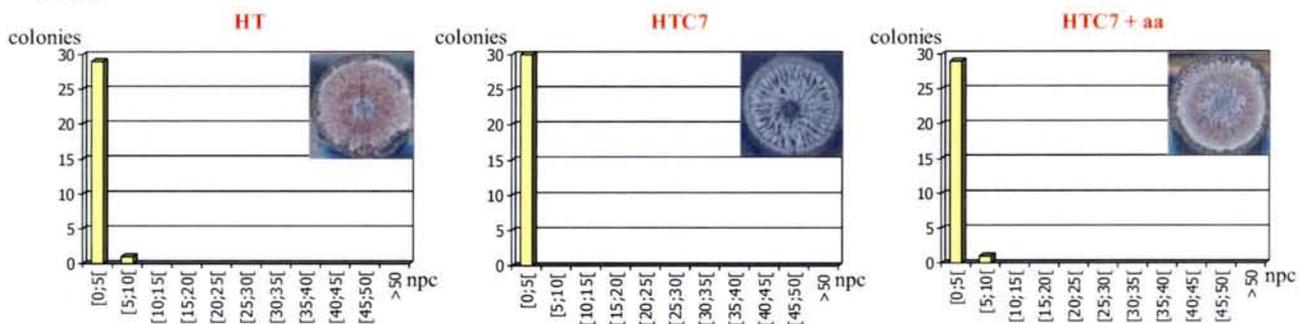


Figure 32 :

Représentation graphique de la distribution du nombre de papilles par colonie (npc) établie chez la souche sauvage M600 (I.) et le mutant *relA* M570 (II.) de *S. coelicolor*. Trente colonies ont été observées après 14 jours de croissance à 30°C sur les milieux HT, HTC7 et HTC7 dans lequel les 18 acides aminés présents normalement dans la bacto-tryptone ont été rajoutés (HTC7 + aa). Les valeurs du npc ont été regroupées par classe de cinq et le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée. Pour chacune de ces distributions, une photographie de colonie correspondant au phénotype le plus représenté est présentée.

Pour la souche M600, ces distributions sont similaires à celles obtenues pour WT8 et M145. Sur milieu HT, les colonies présentaient un relatif faible nombre de papilles, compris entre 0 et 25 alors que sur milieu HTC7, carencé en bacto-tryptone, toutes les colonies produisaient un très grand nombre de papilles, toujours supérieur à 50 (figure 32 I.). Pour le mutant M570, les colonies ne présentaient pas ou très peu de papilles, suggérant que le ppGpp influençait la production de telles papilles (figure 32 II.).

Pour confirmer l'implication du ppGpp dans la production de papilles, le mutant *relA* M570 a été complété par introduction du plasmide pIJ6084 (Sun *et al.*, 2001).

Ce plasmide de 9,5 kb porte :

- ❖ la région de *relA* qui possède l'activité ppGpp synthétase sous le contrôle du promoteur *tip* (inductible par le thiostrepton)
- ❖ le gène de résistance au thiostrepton
- ❖ le gène de résistance à l'apramycine
- ❖ le site *attP* du phage ϕ C31 et le gène codant l'intégrase
- ❖ l'origine de transfert *oriT*

Ce plasmide a été introduit dans la souche M570 par conjugaison suivant le protocole décrit dans la première partie des résultats. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu contenant de l'apramycine. La présence du plasmide intégré au niveau du site *attB* du phage ϕ C31 du génome des transconjugants a été vérifiée par hybridation du plasmide sur des profils de restriction de l'ADN génomique des transconjugants.

Après trois jours de croissance des transconjugants sur les milieux HT et HTC7, le promoteur *tip* qui permet l'expression du ppGpp a été induit en déposant à proximité des colonies un disque imbibé de 6 μ l d'une solution de thiostrepton à 1 μ g/ μ l. Ensuite, les distributions du npc ont été établies pour un des transconjugants obtenus, choisi aléatoirement, après observation de trente colonies sur milieu HT et sur milieu HTC7 (figure 33). Sans induction du promoteur *tip* (figure 33 I.), les colonies présentaient un relatif faible nombre de papilles alors que lorsque la synthèse de ppGpp était induite (figure 33 II.), la plupart des colonies présentait un très grand nombre de papilles supérieur à 50. Ainsi, la restauration de la production de ppGpp, par induction de l'activité ppGpp synthétase, permet le retour à la production importante de papilles blanches sur les colonies. Des expériences réalisées avec le plasmide pIJ6084 par Sun *et al.* (2001) indiquaient qu'une transcription résiduelle à partir du promoteur *tip* avait lieu même sans induction. Cette transcription résiduelle pourrait expliquer la présence d'un faible nombre de papilles sur les colonies du transconjugant même sans induction (figure 33 I.). En effet, une synthèse de base de ppGpp pourrait permettre la production de telles papilles.

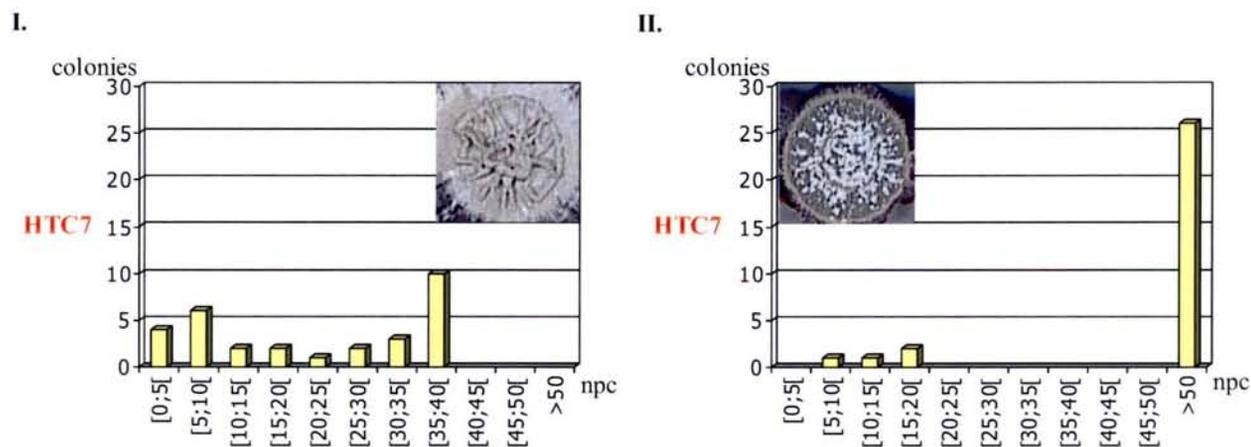
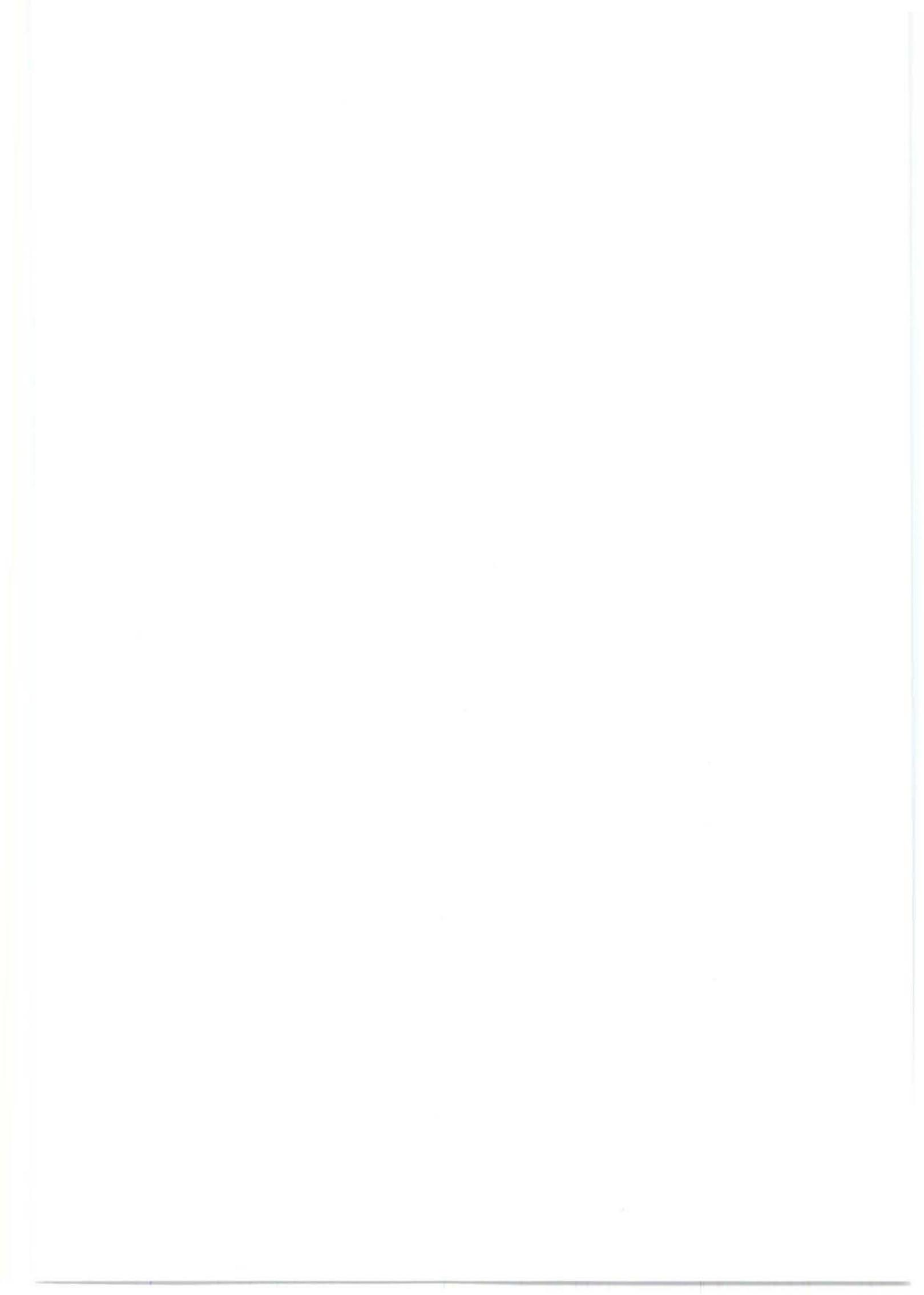


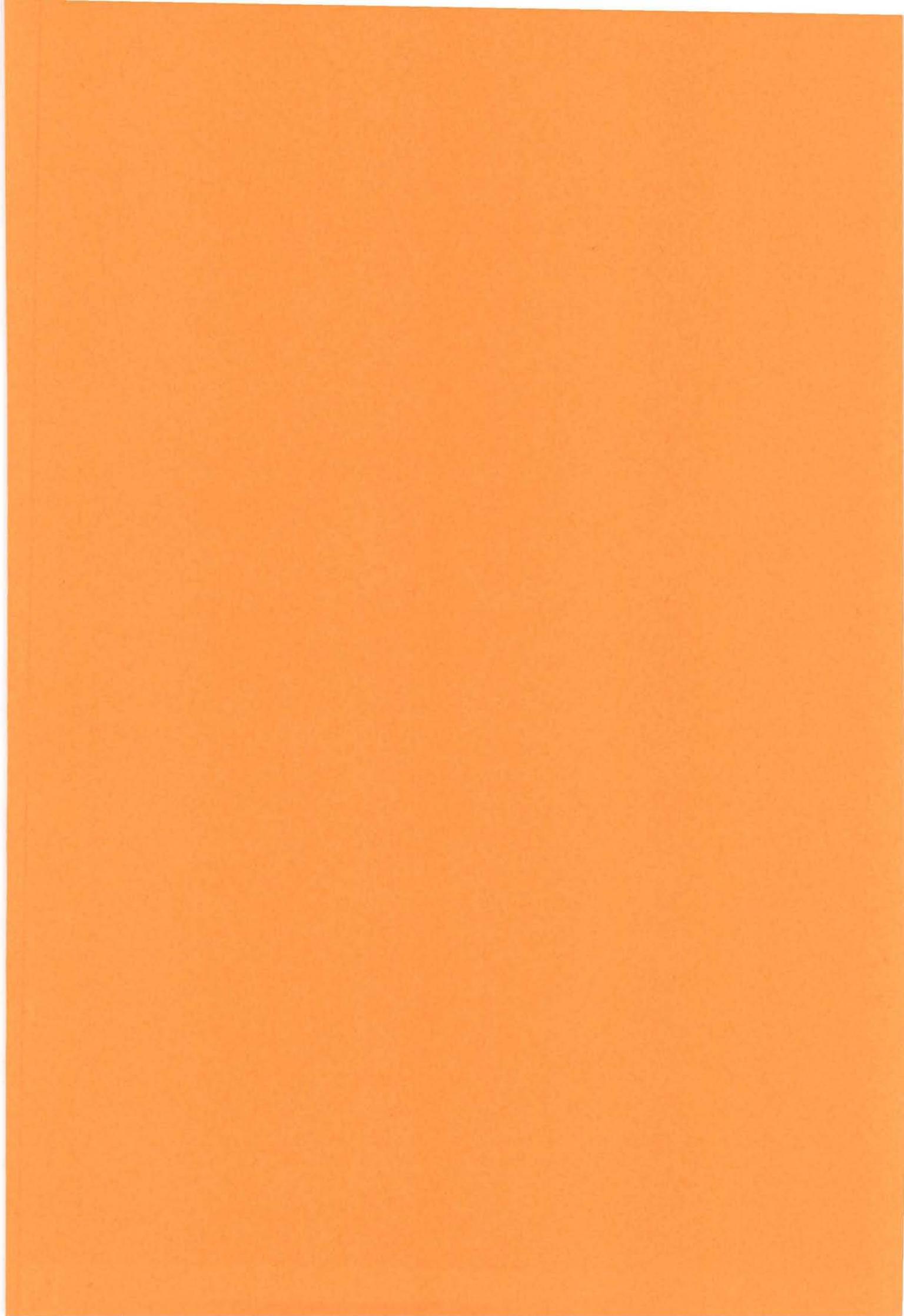
Figure 33 :

Représentation graphique de la distribution du npc établie chez le transconjugant *relA* M570 de *S. coelicolor* complémenté par pIJ6084. Trente colonies ont été observées après 14 jours de croissance à 30°C sur le milieu HTC7 sans (I.) ou avec (II.) induction au thioestrepton. Les valeurs du npc ont été regroupées par classe de cinq et le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée. Pour chacune de ces distributions, une photographie de colonie correspondant au phénotype le plus représenté est présentée.

Ainsi, les résultats obtenus dans ce travail suggèrent fortement qu'il existe une relation entre la réponse stringente et la production de papilles sur les colonies de *Streptomyces*. Ils ont fait l'objet d'une communication orale (voir annexes) et une publication exposant ces résultats est en cours de rédaction.



III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES



L'objectif de cette étude a été de rechercher le déterminisme génétique de l'état mutateur mis en place au cours du développement de *Streptomyces* qui influence le niveau d'instabilité génétique. Dans ce but, les gènes cibles de cet état et plus particulièrement ceux mutés dans les mutants Pig-pap ont été recherchés. Les résultats obtenus au cours de cette étude, ont permis de définir plusieurs facettes de la dynamique mutationnelle puisque nous avons montré que l'expression génique pouvait être modifiée par des réarrangements génomiques pouvant être de grande ampleur, c'est-à-dire qui correspondent à des changements de taille et de conformation du chromosome, ou plus discrets, en affectant la régulation d'un facteur σ impliqué dans une cascade complexe de régulation au cours de la différenciation.

Dans le but de déterminer la nature moléculaire des mutations correspondant aux mutants Pig-pap, la première stratégie utilisée a consisté à construire une banque d'ADN génomique de la souche sauvage de *S. ambofaciens* et à introduire des plasmides recombinants dans un mutant Pig-pap afin de tenter de compléter le phénotype mutant. Au cours de ces expérimentations, un transconjugant présentant un phénotype particulier a été isolé. La caractérisation de la souche 29C1 ainsi obtenue a permis de révéler une structure chromosomique encore jamais décrite chez *Streptomyces*. *La nature des mécanismes moléculaires, facteurs de la dynamique mutationnelle, constituera la première problématique abordée dans cette discussion. Nous nous interrogerons également sur les conséquences physiologiques de cette dynamique chez S. ambofaciens. L'impact de ces réarrangements chromosomiques sur la production de métabolites à intérêt industriel sera enfin évoqué.*

Un autre aspect de la dynamique mutationnelle résulte de la caractérisation phénotypique et moléculaire des mutants Pig-pap. Ainsi, la deuxième stratégie utilisée pour déterminer la modification génétique qui aboutit au phénotype Pig-pap a consisté en la complémentation de ce phénotype par introduction de cinq gènes *whi* de *S. coelicolor*, connus pour intervenir au début du processus de sporulation. Il a été montré que l'introduction du gène *whiG* dans trois mutants Pig-pap restaurait partiellement ou totalement la sporulation et l'aptitude à pigmenter. Les analyses de séquence des allèles *whiG* chez les mutants n'ayant pas révélé la présence de mutation et les analyses transcriptionnelles montrant que *whiG* est bien transcrit suggèrent qu'une modification post-transcriptionnelle de l'expression de ce gène aboutirait au phénotype Pig-pap. De plus, un autre aspect de la mutabilité des mutants Pig-pap a été mise en évidence en analysant des mutants issus du transconjugant pap3(*whiG*), transconjugant qui produit des papilles blanches sur les colonies même après complémentation. Dans ce cas, tous

les mutants analysés présentent une mutation dans le transgène *whiG*. Ce dernier apparaît être une cible mutationnelle à haute fréquence pendant la différenciation du mycélium aérien. *La deuxième partie de la discussion portera donc sur la régulation de σ^{WhiG} ainsi que sur la nature moléculaire des mutants Pig-pap.*

La troisième partie de cette discussion traitera du phénomène de modulation de la mutabilité. Nous avons montré que sur milieu carencé en acides aminés, des colonies à grand nombre de papilles étaient produites et que les colonies d'un mutant *relA* de *S. coelicolor*, ne produisant plus le ppGpp, inducteur de la réponse stringente, ne présentaient pas ou très peu de papilles mutantes sur les colonies. Ainsi, la réponse stringente joue un rôle dans la dynamique mutationnelle et plus particulièrement dans la production à haute fréquence de mutants Pig-pap pendant la différenciation du mycélium aérien. *Une synthèse des modèles de la modification génétique produite chez les mutants Pig-pap et de la mutabilité mise en place lors d'une carence nutritionnelle sera également présentée dans cette discussion.*

1. Dynamique des structures chromosomiques et impacts physiologiques des remaniements

La caractérisation de la souche 29C1 tant au niveau moléculaire que phénotypique nous permet d'aborder plusieurs particularités de l'instabilité génomique chez les *Streptomyces*. Cette instabilité génomique caractérisée par des réarrangements génomiques, en général de grande taille, peut conduire à la modification de la topologie du chromosome et peut également modifier l'organisation de certains gènes, conduisant ainsi à la modulation de leur expression. Dans cette étude, nous avons mis en évidence, au niveau de la région instable du chromosome de *S. ambofaciens*, des événements de réarrangements chromosomiques : une amplification, des délétions et une circularisation, aboutissant alors à une nouvelle conformation du chromosome des *Streptomyces*. De plus, cette structure semble associée à la surproduction d'un pigment par cette souche qui pourrait être un nouveau métabolite secondaire.

1.1. Impact des réarrangements sur la structure du chromosome de *S. ambofaciens*

1.1.1. Nature et régio-spécificité des réarrangements chromosomiques chez *S. ambofaciens*

L'instabilité génétique caractérisée chez les *Streptomyces*, qui se manifeste par l'apparition à haute fréquence (>1%) de mutants dans la descendance d'une colonie sauvage, avait été corrélée à la formation de réarrangements chromosomiques de grande ampleur. Deux grands types de réarrangements chromosomiques ont été caractérisés : des délétions de grande taille et des amplifications de séquences d'ADN appelées AUD (Leblond & Decaris, 1994). Le chromosome des *Streptomyces* est linéaire (Leblond *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993; Pandza *et al.*, 1997) et possède une structure de type invertronique caractérisée par des séquences terminales inversées, appelées TIR, liées de façon covalente à des protéines. La majorité des réarrangements chromosomiques caractérisés affecte les extrémités du chromosome ainsi que sa structure puisque certains chromosomes mutants sont circulaires (Fischer *et al.*, 1997;

Volff & Altenbuchner, 1997). La région principalement touchée par les réarrangements chromosomiques affecte les deux extrémités du chromosome et est qualifiée de région instable. Elle est non essentielle dans les conditions de laboratoire et sa taille est d'environ 2 Mb soit $\frac{1}{4}$ du génome chez *S. ambofaciens* DSM40697 et 1 Mb chez *S. lividans* (Leblond *et al.*, 1996; Redenbach *et al.*, 1993). Chez *S. coelicolor*, l'instabilité chromosomique n'a pas été étudiée de façon approfondie et la taille de la région instable n'est donc pas connue.

Malgré des remaniements chromosomiques fréquents qui caractérisent la région instable, cette région n'est pas vide de gènes. En effet, elle présente la même densité de gènes que le reste du chromosome. Cependant, l'analyse de leur fonction a révélé une véritable compartimentation de l'information génétique. La séquence complète du génome de *S. coelicolor* a révélé une forte concentration de gènes dits essentiels dans une région d'environ 4,9 Mb qui constitue le « core » du chromosome (Bentley *et al.*, 2002). Ce sont les gènes codant notamment des fonctions impliquées dans la division cellulaire, dans la réplication de l'ADN, dans la transcription, dans la traduction ou dans la biosynthèse d'acides aminés. Cette région « core » est centrée sur l'origine de réplication et correspond à la partie centrale du chromosome. Les bras chromosomiques sont définis comme les régions terminales gauche de 1,5 Mb et droite de 2,3 Mb dans lesquelles les gènes essentiels sont rares et qui contiennent des gènes qualifiés de contingence. Ce sont des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, dans l'expression du métabolisme secondaire ou dans la réponse aux changements environnementaux. De plus, cette région est particulièrement riche en ORF codant des transposases putatives. Cette présence suggère que cette compartimentation pourrait résulter d'un mécanisme d'accrétion de séquences acquises par transfert horizontal (Bentley *et al.*, 2002). Le séquençage des régions terminales du chromosome de *S. ambofaciens* ATCC23877 a été initié au Génoscope en collaboration avec les équipes de P. Leblond et J.L. Pernodet. Le début de l'analyse des séquences confirme la nature spécifique des ORF contenues dans les régions terminales. En effet, un grand nombre d'ORF code des transposases putatives ainsi que des métabolites secondaires (Pang *et al.*, 2004; P. Leblond, communication personnelle).

La majorité des réarrangements affecte donc les extrémités du chromosome. Seul un cas de réarrangement génomique de grande taille dans la région centrale a été décrit chez *S. coelicolor* M145 (Redenbach *et al.*, 2000). Il s'agit d'un cas d'amplification affectant des séquences de 19,9 kb et 16 kb. Alors que l'amplification est très souvent associée à la délétion

d'une région flanquante, dans ce cas précis, aucune délétion de grande taille n'a été associée à l'amplification. Ainsi, il est très probable que la formation de grandes délétions dans la région « core » comportant principalement des gènes essentiels soit fortement contre-sélectionnée. Après comparaison de séquences de génomes séquencés, il a été montré que l'organisation génétique est fortement conservée dans la région interne du chromosome alors que les régions terminales sont variables et sont permissives aux réarrangements. L'analyse de la répartition des gènes sur le chromosome indique que cette permissivité du chromosome aux réarrangements ne révélerait pas forcément une fréquence de réarrangements plus importante dans les régions terminales mais peut-être une pression de sélection élevée sur la formation de réarrangements au niveau des régions terminales en conditions de laboratoire.

1.1.2. Mise en évidence d'une nouvelle région amplifiable : l'AUD37

Deux types d'AUD sont distingués au niveau structural : l'AUD de type I et celle de type II. Les AUD de type I ne semblent pas présenter de structure particulière. Elles peuvent appartenir à la même région mais leur taille est variable. Par contre, les AUD de type II sont caractérisées par la présence de répétitions directes flanquant une séquence unique et les amplifications, qui ont lieu à partir de telles AUD, sont souvent de même taille. Chez *S. ambofaciens* DSM40697, 48 événements d'amplification avaient été caractérisés, ce qui avait permis d'identifier deux régions amplifiables situées dans la région instable : la région de l'AUD6, avec 10 cas d'amplifications sur les 48 testés, et l'AUD90, avec 24 cas sur 48. Ces deux régions regroupent 71 % des cas d'amplifications caractérisées dans cette souche. Les AUD appartenant à ces deux régions sont des AUD de type I (Demuyter *et al.*, 1988).

La caractérisation moléculaire de la souche 29C1 décrite dans ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle région amplifiable chez *S. ambofaciens*. Cette région nommée AUD37, car la taille de la région amplifiable est d'environ de 37 kb, est localisée au niveau des TIR. Ainsi, il s'agit d'une situation originale dans la mesure où cette région amplifiable est présente dans une séquence déjà dupliquée située sur chacune des extrémités du chromosome. Toutes les AUD caractérisées préalablement à cette étude étaient en séquence unique. La découverte de la présence en deux exemplaires, car située dans les TIR, d'une séquence amplifiable pose donc la question de l'impact de ces séquences dupliquées dans l'évolution. *Est-ce que les deux AUD sont fonctionnelles ? Ou une seule AUD (toujours la même ?) est à l'origine de l'amplification ?* L'hypothèse de deux AUD fonctionnelles

suppose que la probabilité de générer une amplification au niveau de cette séquence amplifiable serait doublée. Or, ce type d'événement est peu fréquent puisque sur tous les mutants amplifiés et caractérisés avant ce travail, aucun ne présentait une amplification au niveau des TIR. Cette donnée suggère que le mécanisme conduisant aux réarrangements génomiques de la souche 29C1 serait complexe et peu fréquent.

1.1.3. Les différentes structures chromosomiques caractérisées

L'élucidation de la structure chromosomique de certains mutants a révélé une grande hétérogénéité dans la taille et la conformation du chromosome. Plusieurs mutants isolés de la souche *S. ambofaciens* DSM40697 ont été caractérisés. Ils présentent tous une taille des TIR et/ou une conformation variable(s). Préalablement à la caractérisation de la souche 29C1, quatre types de mutants avaient été publiés. La structure chromosomique dite sauvage chez *S. ambofaciens* est linéaire et présente une origine de réplication (*oriC*) située approximativement au centre du chromosome et qui définit deux bras chromosomiques. Cette structure est représentée dans la figure 34.

- ❖ Le premier type de mutants comporte un ADN chromosomique linéaire avec une taille des TIR réduite et un décentrage de *oriC* (figure 34 I.). Ce mutant est généré par un événement de recombinaison entre une séquence située à l'intérieur de la TIR et une séquence située à l'intérieur du bras chromosomique (Fischer *et al.*, 1997). Chez les deux mutants analysés, la taille des délétions a été estimée à 490 kb et 1225 kb et la taille des TIR passe de 210 kb pour la souche sauvage à 200 kb et 100 kb pour les mutants.
- ❖ Le deuxième type de mutant résulte d'un événement de recombinaison entre séquences situées sur les deux bras chromosomiques, aboutissant à la perte des deux télomères et à la circularisation du chromosome (figure 34 II.) (Fischer *et al.*, 1997). Dans ce cas, la délétion est de grande taille (environ 2300 kb) et aucune séquence composant les TIR ne persiste.

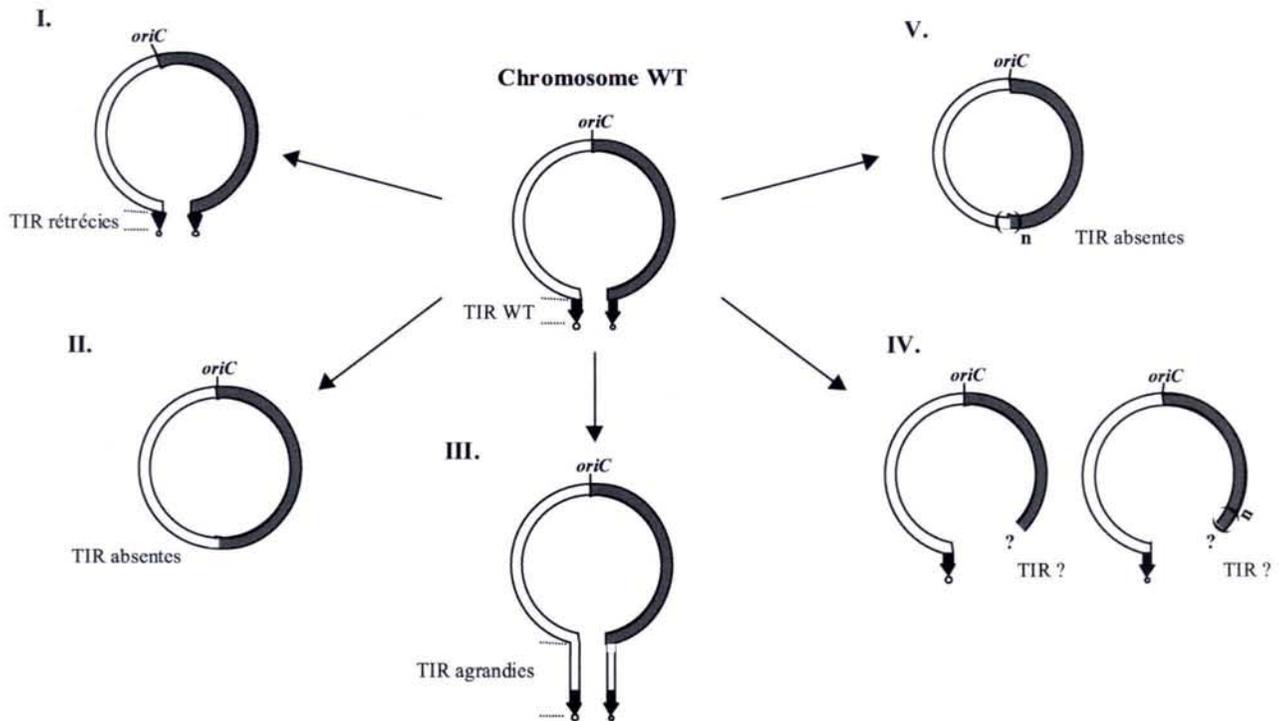


Figure 34 :

Représentation schématique des différentes structures chromosomiques générées par l'instabilité génétique et observées chez des mutants de *S. ambofaciens*. Le chromosome sauvage (WT) est linéaire et présente à ses extrémités des répétitions terminales inversées (TIR) associées à des protéines terminales (o). **I.** Type de mutant présentant une structure linéaire avec une taille des TIR réduite. **II.** Type de mutant caractérisé par une structure circulaire et une absence de TIR. **III.** Type de mutant présentant une structure linéaire avec une taille des TIR augmentée. **IV.** Type de mutant présentant une structure linéaire avec une extrémité de nature inconnue (?). Dans certains cas, cette extrémité peut présenter une amplification (n), n étant le nombre de copies réitérées (Dary *et al.*, 1999). **V.** Nouveau type de mutant caractérisé dans ce travail au travers de l'étude moléculaire de la souche *S. ambofaciens* 29C1. Le chromosome présente une grande délétion des extrémités, les TIR sont absentes et une amplification (n) flanque ces délétions.

- ❖ Le troisième type de mutants correspond aux mutants comportant un ADN chromosomique linéaire avec des TIR de taille très supérieure à celle des TIR sauvages (figure 34 III.). Dans cette catégorie sont répertoriés les mutants NSA135HPP et NSA855 qui présentent respectivement des TIR de 480 kb et 850 kb (Fischer *et al.*, 1998). Ce type de structure résulte d'un remplacement d'une extrémité qui a été délétée par une séquence identique à l'autre extrémité. De plus, le mutant *S. ambofaciens* NSA27 qui provient d'une fusion tête-bêche de deux chromosomes partiellement délétés fait partie de cette catégorie de mutants et en constitue un cas extrême (Wenner *et al.*, 2003). En effet, dans ce type de structure, une très grande partie du chromosome (environ 6500 kb) constituerait les TIR, seuls quelques centaines de kb restant en séquence unique.

- ❖ Le quatrième type de mutants caractérisés chez *S. ambofaciens* est constitué de mutants présentant une structure chromosomique linéaire avec une extrémité délétée avec ou sans amplification adjacente au point de délétion (figure 34 IV.). Tous les mutants amplifiés caractérisés jusqu'à présent appartenaient à cette catégorie (Fischer *et al.*, 1997). Chez *S. lividans*, la plupart des mutants amplifiés semblent également présenter cette structure (Rauland *et al.*, 1995).

- ❖ Dans notre étude, la caractérisation de la structure chromosomique de la souche 29C1 a permis de révéler une nouvelle catégorie de mutants et donc un cinquième type de mutant (figure 34 V.). Il s'agit en effet d'un mutant présentant de larges délétions au niveau des deux extrémités du chromosome, ces délétions flanquant une amplification. De plus, des données moléculaires obtenues indiquent que le chromosome de cette souche serait circulaire.

L'originalité de cette structure réside dans la présence de deux délétions qui bordent une amplification. Il est ainsi intéressant de s'interroger sur le rôle de l'amplification au sein de la topologie du chromosome. Dans le cas d'un chromosome présentant une amplification sur un bras chromosomique associée à la délétion de cette extrémité (catégorie IV. des mutants), cette amplification pourrait jouer le rôle de télomères. L'ADN amplifié constituerait, dans ce cas, la nouvelle extrémité (Rauland *et al.*, 1995). Les télomères correspondent à des extrémités chromosomiques et possèdent plusieurs fonctions. Ils permettent de protéger les extrémités des réplicons linéaires des dégradations causées par les exonucléases et permettent la réplication de leurs extrémités 3'. En effet, les chromosomes

linéaires sont confrontés au problème de la réplication de leurs extrémités 3'. Le brin non continu constitué de fragments d'Okazaki joints ne peut être entièrement répliqué, étant donné que la progression de la fourche de réplication est polarisée de 5' vers 3'. Les télomères peuvent également jouer un rôle structural puisqu'il a été montré, chez *Streptomyces*, qu'ils sont étroitement associés au sein d'une cellule. Ainsi, dans le cas de la souche 29C1, l'absence des extrémités télomériques et la circularité du chromosome suggèrent que le rôle des télomères n'est plus indispensable. *L'amplification chez la souche 29C1 jouerait-elle un rôle dans le maintien de la structure du chromosome ?*

1.1.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans les réarrangements chromosomiques

Les réarrangements chromosomiques de type délétion et amplification résultent de l'intervention de mécanismes moléculaires faisant intervenir la recombinaison homologe ou illégitime. Chez *Streptomyces*, la caractérisation moléculaire de mutants présentant des réarrangements génomiques a montré que les points de recombinaison utilisés pour générer ces réarrangements étaient multiples.

Chez de nombreux mutants, l'analyse des extrémités des délétions a permis de détecter des micro-homologies. Ceci suggère que les délétions résultent fréquemment d'événements de recombinaison non homologe. Il a été montré chez *Streptomyces glaucescens* que des réarrangements chromosomiques de grande ampleur de type délétion étaient le résultat d'événements complexes de recombinaison non homologe pouvant par ailleurs impliquer des duplications géniques (Birch *et al.*, 1991). Chez *Streptomyces rimosus*, un échange d'extrémités entre le chromosome et un plasmide linéaire possédant des TIR de 387 kb a été caractérisé. Une micro-homologie de 4 pb a été identifiée au point de recombinaison (Pandza *et al.*, 1998). Par ailleurs, la fusion chromosomique décrite chez le mutant *S. ambofaciens* NSA27 est expliquée par des événements de recombinaison non homologe qui font intervenir une micro-homologie de 6 pb (Wenner *et al.*, 2003).

La recombinaison homologe peut également être impliquée dans certains événements de délétions et dans les amplifications. Chez *S. ambofaciens*, les remplacements d'extrémités chromosomiques ont été mis en évidence grâce à la caractérisation moléculaire de deux

souches : NSA135HPP et NSA855 (Fischer *et al.*, 1998). Ces remplacements résultent d'événements de recombinaison homologue entre les gènes dupliqués *hasR* et *hasL* présentant environ 98 % d'identité en nucléotides et situés respectivement à 850 kb et 480 kb des extrémités droite et gauche du chromosome. En fait, la structure chromosomique du mutant NSA135HPP résulte d'un événement de délétion de 850 kb de l'extrémité du bras chromosomique droit et de son remplacement par une séquence de 480 kb de l'extrémité gauche. Par contre, pour le mutant NSA855, le bras chromosomique gauche est délété de 480 kb à partir de son extrémité et une séquence de 850 kb de l'extrémité droite a été dupliquée et fusionnée au point de délétion (Fischer *et al.*, 1998). Un autre exemple de remplacement de bras chromosomique a été décrit chez un mutant de *Streptomyces griseus* (Kameoka *et al.*, 1999). Ce réarrangement chromosomique implique un événement de recombinaison homologue entre deux copies d'un gène codant une lipoprotéine et présentant plus de 99 % d'identité en nucléotides. Ces deux copies, *orfR* et *orfL*, sont localisées à l'extérieur des TIR, respectivement à 250 kb et 450 kb des extrémités des bras chromosomiques droit et gauche du chromosome linéaire de *S. griseus*. Chez le mutant, le remplacement de bras aboutit à la duplication de 450 kb de séquences du bras gauche à l'extrémité du bras droit délété et à l'augmentation de la taille des TIR de 24 kb chez la souche sauvage à 450 kb chez la souche mutante (Kameoka *et al.*, 1999). Par ailleurs, il est à noter que des événements de recombinaison homologue pourraient être fréquents à l'intérieur des TIR, notamment par leur proximité physique. Cependant, ce type d'événement passerait inaperçu étant donné que, s'il n'est pas associé à des délétions, il conduirait au remplacement à l'identique de l'extrémité chromosomique.

Chez *Streptomyces*, le mécanisme d'amplification reste à élucider. Dans la mesure où les AUD de type II ressemblent à celles caractérisées chez d'autres bactéries dont *E. coli*, le mécanisme d'amplification pourrait être similaire. Les mécanismes décrits peuvent impliquer soit des crossing-over (CO) inégaux soit des réinsertions de cercles roulants (figure 35). Les CO inégaux se forment pendant le passage de la fourche de réplication alors que le deuxième mécanisme, excision de cercles et réinsertion, requiert la présence de deux réplicons dans la cellule. Dans le premier cas, suite à une recombinaison intramoléculaire, deux produits, un délété et un dupliqué, sont générés (figure 35 I.). Dans le deuxième cas, une recombinaison entre deux séquences répétées génère un produit délété et un cercle excisé qui peut ensuite recombiner avec une deuxième molécule générant ainsi une duplication (figure 35 II.). La

présence d'intermédiaires circulaires a été mise en évidence dans plusieurs systèmes (Flores *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1984).

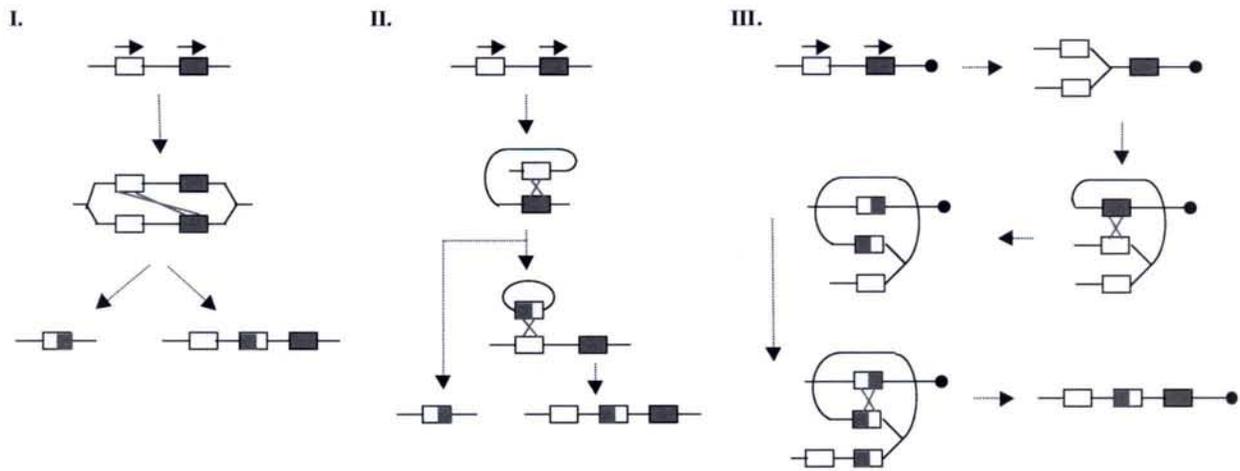


Figure 35 :

Mécanismes d'amplification génique chez les bactéries (d'après Romero & Palacios, 1997). Les séquences répétées en orientation directe (\rightarrow) sont symbolisées par des rectangles gris clair ou gris foncé. Le rectangle mixte (gris clair et gris foncé) représente le résultat d'un événement de recombinaison. Les événements de recombinaison (crossing-over) sont schématisés par des croix. **I.** Mécanisme d'amplification impliquant des crossing-over inégaux. **II.** Mécanisme d'amplification par excision de cercle et réinsertion. **III.** Mécanisme d'amplification par cercle roulant. L'extrémité du bras chromosomique est représentée dans cette figure (\bullet).

Ces deux mécanismes impliquent une augmentation graduelle du nombre de copies réitérées et ces modèles ne peuvent ainsi expliquer ni l'augmentation drastique apparente et subite du nombre de copies dans les amplicons décrits chez *Streptomyces* ni la présence de délétions associées aux amplifications. Une hypothèse formulée par Young et Cullum impliquant à la fois des processus de recombinaison et de réplication pourrait rendre compte de ce type de réarrangement (Young & Cullum, 1987). Ce modèle, présenté dans la figure 35 III., propose qu'une fourche de réplication pourrait rester séquestrée dans une structure circulaire qui reste attachée à un bras chromosomique. Cette structure serait générée par recombinaison intramoléculaire entre répétitions directes pendant que la fourche serait en train de répliquer l'AUD. Considéré comme un mécanisme à cercle roulant, ce modèle permet la production d'amplifications en tandem en un très grand nombre de copies. Par ailleurs, la résolution de cette structure par recombinaison peut entraîner la délétion des séquences chromosomiques adjacentes. Ceci pourrait expliquer les événements de délétion qui sont généralement associés aux amplifications chez les *Streptomyces*.

La caractérisation de la structure du chromosome de la souche 29C1 entreprise au cours de ce travail pourrait être poursuivie. Il serait en effet intéressant de préciser ce nouveau type de structure, par une caractérisation moléculaire plus fine de la région remaniée, afin d'identifier le (ou les) mécanisme(s) qui pourrai(en)t contrôler ces remaniements. En effet, *s'agit-il d'événements issus de recombinaison non homologue ? Existe-t-il des micro-homologies au niveau des points de jonction ? S'agit-il d'événements issus de recombinaison homologue ?*

Par ailleurs, le modèle de Young et Cullum ne peut expliquer à lui seul l'événement qui a conduit à la formation de la structure chromosomique de la souche 29C1. Cette structure résulterait de plusieurs événements de réarrangements chromosomiques et ce mécanisme est complexe. En effet, le modèle, le plus simple, serait d'envisager que l'amplification aurait eu lieu sur une des deux TIR et serait associée à la délétion de l'extrémité de cette TIR et d'une partie de l'autre bras chromosomique, conduisant ainsi à un chromosome circulaire. Un événement de délétion additionnel se serait également produit en amont de l'amplification. La structure du chromosome de la souche 29C1 dériverait donc d'événements de remaniements successifs et complexes, ce qui pourrait ainsi expliquer son originalité parmi tous les mutants qui avaient été caractérisés préalablement.

1.1.5. Stabilité des chromosomes remaniés

Les chromosomes remaniés, générés par l'instabilité génétique, sont en général instables. Par exemple, l'instabilité de la structure chromosomique du mutant NSA205 de *S. ambofaciens* qui porte une amplification dans l'AUD90 est d'environ 10 % (Dary *et al.*, 1992). Pour le mutant NSA27 qui présente une structure chromosomique résultant d'une fusion tête bêche de deux chromosomes linéaires partiellement délétés dans le même bras chromosomique, il a été montré que cette structure était associée à une instabilité chromosomique (Wenner *et al.*, 2003). Cette instabilité chromosomique a été estimée à 36,4 %. Cette structure est réarrangée à haute fréquence et après ségrégation aboutit à des structures chromosomiques diverses : de nouvelles fusions chromosomiques (linéaires ou circulaires), des chromosomes linéaires ayant perdu la duplication parentale et portant des TIR de taille variable. Ce type d'instabilité chromosomique présente des similitudes avec le phénomène d'instabilité des chromosomes dicentriques chez les eucaryotes. Ce phénomène est basé sur la succession de cycles cassure-fusion-pont, phénomène initialement décrit par

Mc Clintock en 1951 et ensuite précisé par des expériences notamment réalisées sur *Saccharomyces cerevisiae* (Moore & Haber, 1996). Par ailleurs, il a été montré par Fisher *et al.* (1997) que l'instabilité des chromosomes circularisés était supérieure à celle de la souche sauvage. Elle a été estimée à 2,3 %, 5,7 % et 7,1 % pour les trois souches testées contre 0,35 % pour la souche sauvage dans les mêmes conditions (Fisher *et al.*, 1997). Nous avons estimé, pour la souche 29C1, une fréquence de perte de l'amplification de l'ordre de 20 %. Chez cette souche, la perte de l'amplification a été associée à la perte de la production du pigment vert. L'instabilité chromosomique serait donc associée à une instabilité phénotypique. Ainsi, la structure des chromosomes fusionnés et circularisés, comme dans le cas de la souche 29C1, confère un état pouvant être qualifié de mutateur aux souches mutantes.

1.2. Impacts physiologiques des remaniements chromosomiques chez *S. ambofaciens*

1.2.1. Réarrangements chromosomiques et production d'antibiotiques

La souche 29C1 caractérisée dans cette étude présente la particularité de produire un pigment vert excrété dans le milieu de culture. Par ailleurs, il existerait une relation entre cette production et les réarrangements chromosomiques détectés chez cette souche. En effet, l'étude de colonies dépigmentées isolées dans la descendance de la souche 29C1 a montré que l'aptitude à produire le pigment vert est abolie lorsque l'amplification est perdue (18 cas/18). Par contre, toutes les colonies contenant une amplification (17 cas/17) sont vertes. Cette observation peut poser les questions suivantes : *cette nouvelle AUD, l'AUD37, porte-t-elle des gènes spécifiques, par exemple des gènes impliqués dans la production de pigment tel un gène codant une polycétone synthétase PKS (polyketide synthase) ? L'amplification de l'AUD modifie-t-elle une cascade de régulation pour la synthèse d'un tel pigment ? Conduit-elle à la surexpression d'un gène mosaïque, produit d'un événement de remaniement ?*

Jusqu'à présent, le séquençage des AUD de *Streptomyces* a révélé la présence de gènes de nature variée dans ces régions. Des gènes codant des chitinases, des gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ou des gènes codant des polycétones

synthétases ou des protéines similaires à des répresseurs ont été détectés. Chez *S. ambofaciens*, l'AUD90 comporte au moins un gène de polycétone synthétase, l'*orfPS* (Aigle *et al.*, 1996). Par ailleurs, le séquençage partiel de l'AUD6 a révélé la présence d'ORF présentant des homologies avec des régulateurs transcriptionnels de type répresseur (Aubert *et al.*, 1993).

Plusieurs souches mutantes amplifiées chez *S. ambofaciens* ATCC23877 obtenues après plusieurs mutagénèses ont été caractérisées. Toutes les séquences amplifiées dans ces souches présentent une taille variable et appartiennent à une même région, appelée AUD205, homologue à l'AUD90 de *S. ambofaciens* DSM40697 (Aigle *et al.*, 1996). Il a été montré que toutes les souches amplifiées étaient non productrices de spiramycine. Par ailleurs, la perte de l'amplification était corrélée au retour à la production de spiramycine. Ainsi, il a été postulé que la surexpression de *orfPS* conduit à une dérivation des précurseurs de la synthèse de la spiramycine et donc à un phénotype non producteur. De plus, la souche amplifiée NSA205 présente un contenu lipidique altéré et une accumulation d'un nouveau métabolite secondaire de nature inconnue, ce qui confirme l'idée d'une déviation métabolique des précurseurs tels des acides gras activés utilisés à la fois par la synthétase des acides gras et par la polycétone synthétase (Schauner *et al.*, 1999). Ainsi, les réarrangements chromosomiques peuvent affecter à la fois le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. La souche 29C1 est un candidat intéressant pour l'étude de l'impact physiologique des réarrangements génomiques, par ses particularités phénotypiques et moléculaires.

1.2.2. Existe-t-il une relation entre l'AUD37 amplifiée chez la souche 29C1 et le cluster *alp* ?

Chez *S. ambofaciens*, Pang *et al.* (2004) ont récemment mis en évidence une nouvelle PKS de type II, produit du cluster appelé *alp* pour « angucycline-like polyketide » (Pang *et al.*, 2004). Ce cluster présente la particularité d'être en deux exemplaires dans le génome car il est situé dans les TIR. En effet, ce cluster peut être révélé par hybridation avec le cosmide F6 qui reconnaît une région des TIR de *S. ambofaciens* ATCC23877 (figure 36). L'étude du double mutant a montré que ce dernier, contrairement à la souche sauvage, ne produisait plus un pigment orangé diffusible et ne présentait plus d'activité antibiotique contre *B. subtilis* sur

le milieu de culture testé (Pang *et al.*, 2004). Il est à noter que la spiramycine, antibiotique également produit par *S. ambofaciens*, présente normalement une activité anti *B. subtilis*. Pang *et al.* (2004) ont montré par des expériences de HPLC que la spiramycine était toujours produite dans le double mutant *alp*. Ainsi, le milieu de culture utilisé (R2) empêcherait de détecter l'activité de la spiramycine ou la quantité de spiramycine produite n'est pas suffisante pour inhiber la croissance de *B. subtilis*. Par ailleurs, les simples mutants *alp* (avec un cluster *alp* interrompu sur une des deux TIR) ayant un phénotype intermédiaire, entre celui de la souche sauvage et celui du double mutant *alp*, suggèrent que les deux clusters sont fonctionnels (Pang *et al.*, 2004).

Lorsque la localisation des différents cosmides révélant certaines régions des extrémités du génome de *S. ambofaciens* ATCC23877 et *S. ambofaciens* DSM40697 est comparée, nous pouvons constater que le cosmide A68 (renommé AD68 sur la figure 36) utilisé pour révéler l'amplification chez la souche 29C1 est homologue au cosmide F6 qui révèle le cluster *alp* (figure 36). 26 gènes identifiés et séquencés constituent le cluster *alp* (Pang *et al.*, 2004). Chacun de ces gènes présente une fonction nécessaire à la synthèse de l'angucycline (tableau 5).

La carte de restriction *Bam*HI du cosmide F6 et par conséquent du cluster *alp* a été établie à partir de la séquence du cosmide (Pang *et al.*, 2004 ; figure 37). La taille des fragments *Bam*HI amplifiés chez 29C1 et révélés par le cosmide recombinant A68 (l'homologue à F6) avait été estimée à l'aide d'un marqueur de taille et n'a donc pas la même précision que celle du cosmide F6. Il est toutefois possible de comparer la carte de restriction *Bam*HI du cosmide F6 avec celle de la région amplifiée chez 29C1 (figure 37). Le point de délétion en amont de l'amplification n'étant pas exactement connu, la région potentiellement amplifiée du fragment *Bam*HI de 18 kb est en pointillé sur la figure. Comme la taille du fragment de jonction créé par la réitération en tandem de l'AUD37 a été estimée à 22 kb, répartis sur les fragments de 18 kb et 19 kb (figure 18), une séquence d'au moins 3 kb (22 kb – 19 kb) du fragment de 18 kb est amplifiée chez la souche 29C1. Ainsi, les gènes *alpH*, *alpG*, *alpF*, *alpE*, *alpD*, *alpC*, *alpB*, *alpA*, *alpI*, *alpJ*, *alpK* et *alpL* seraient amplifiés chez la souche 29C1. Les gènes *alpM*, *alpN*, *alpO*, *alpP*, *alpQ*, *alpR* et *alpS* seraient potentiellement amplifiés ou délétés chez cette souche. Enfin, les gènes *alpT*, *alpU*, *alpV*, *alpW*, *alpX*, *alpY* et *alpZ* seraient délétés chez la souche 29C1 (tableau 5 et figure 37).

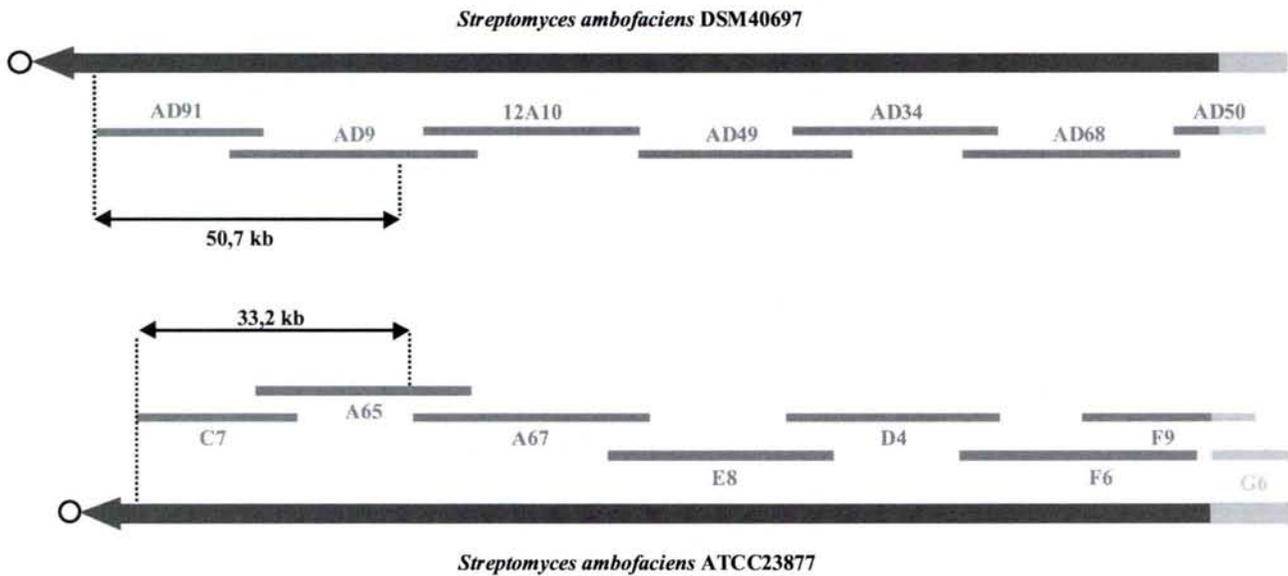


Figure 36 :

Représentation schématique d'une extrémité du chromosome de *S. ambofaciens* DSM40697 (en haut) et *S. ambofaciens* ATCC23877 (en bas) et localisation des cosmides révélant certaines régions de ces extrémités. Les TIR sont représentées par la flèche noire et les protéines terminales par un rond. Les régions non homologues entre les deux souches sont indiquées par les doubles flèches et la taille de ces régions est indiquée (d'après Borges, 2001).

Tableau 5 :

Récapitulatif du nom et de la fonction putative des gènes identifiés après séquençage et appartenant au cluster *alp* (d'après Pang *et al.*, 2004). La catégorie des gènes amplifiés, délétés chez la souche 29C1 est indiquée. De plus, la catégorie des gènes dont le comportement est indéterminé est indiquée par ?.

	Gènes	Fonctions putatives	
Gènes amplifiés	<i>alpH</i>	O-Méthyltransférase	
	<i>alpG</i>	Oxygénase	
	<i>alpF</i>	Oxygénase	
	<i>alpE</i>	Cyclase/déshydrase	
	<i>alpD</i>	Kétoréductase	
	<i>alpC</i>	Protéine "Acyl Carrier"	
	<i>alpB</i>	Facteur d'élongation de chaînes	
	<i>alpA</i>	Kétoacyl Synthase	
	<i>alpI</i>	Cyclase	
	<i>alpJ</i>	Anthrone oxydase	
	<i>alpK</i>	Oxygénase	
	<i>alpL</i>	Inconnue	
	?	<i>alpM</i>	Peptide synthétase
<i>alpN</i>		Phosphopantéthéinyltransférase	
<i>alpO</i>		Acyl-coenzyme A déshydrogénase	
<i>alpP</i>		Cyclase/déshydrase	
<i>alpQ</i>		Facteur d'élongation de chaînes	
<i>alpR</i>		Kétoacyl Synthase	
<i>alpS</i>		Thioestérase	
<i>alpT</i>		Régulateur	
Gènes délétés		<i>alpU</i>	Régulateur
		<i>alpV</i>	Régulateur
	<i>alpW</i>	Régulateur	
	<i>alpX</i>	Décarboxylase	
	<i>alpY</i>	Inconnue	
	<i>alpZ</i>	Protéine récepteur butyrolactone	

Parmi tous les gènes du cluster, quatre gènes (*alpT*, *alpU*, *alpV* et *alpW*) codant des protéines régulatrices seraient absents chez la souche 29C1. Ceci suggère que la synthèse d'angucycline chez 29C1 est probablement dérégulée. De plus, chez ce mutant, d'autres gènes codant des enzymes indispensables à la cascade de biosynthèse d'angucycline seraient potentiellement absents chez 29C1. Ce résultat suggère fortement que chez 29C1, la synthèse de l'angucycline ne peut être achevée. Des expériences de HPLC, permettant d'identifier la présence ou l'absence d'angucycline en tant que telle, confirmeraient cette hypothèse. Dans ce cas, la production du pigment vert par la souche 29C1 ne peut être expliquée par une surproduction d'angucycline mais pourrait correspondre à un produit intermédiaire issu d'une dérivation de la cascade de régulation de cet antibiotique et qui serait surproduit chez 29C1. En effet, les trois gènes (*alpA*, *alpB* et *alpC*), constituant la PKS minimale (Pang *et al.*, 2004), sont amplifiés chez la souche 29C1, ce qui suggère qu'un métabolite serait surproduit.

Il serait intéressant d'identifier le pigment produit par la souche 29C1. *S'agit-il d'un précurseur de l'angucycline surproduit ? S'agit-il d'un pigment déjà connu mais surproduit ? S'agit-il d'un nouveau pigment ? D'un nouvel antibiotique ? Ces réarrangements ont-ils contribué à la formation d'un gène « mosaïque » ?* En effet, la délétion en amont de la séquence amplifiée s'étend jusqu'au niveau de l'AUD90, révélé par le cosmide 23E11 (figure 18). Afin de confirmer la présence chez 29C1 d'un nouveau gène qui aurait une fonction potentielle dans la biosynthèse d'un métabolite, il serait intéressant de préciser la limite de la délétion par séquençage de cette région.

2. Etude de la dynamique mutationnelle au cours de la différenciation morphologique chez *S. ambofaciens*

2.1. Les mutants Pig-pap : un nouvel aspect de l'instabilité génétique

L'instabilité génétique décrite chez différentes espèces de *Streptomyces* genre, suivant le stade de développement auquel se produit l'événement, différents types de mutants. Il s'agit des mutants Pig-col, probablement issus d'événements mutationnels se produisant au cours de la germination d'une spore, des mutants Pig-sec qui seraient issus d'événements mutationnels survenus lors de la formation du mycélium végétatif et des mutants Pig-pap dérivant vraisemblablement d'événements mutationnels produits lors du développement du mycélium aérien (Martin *et al.*, 1999). Ces différents types de mutants ont longtemps été considérés comme dérivant d'un même type d'événement mutationnel survenu à différents stades du développement de la colonie. Cependant, l'analyse moléculaire de ces différents mutants a permis de réfuter cette hypothèse (Martin *et al.*, 1999). Notamment, contrairement aux mutants Pig-col et Pig-sec, aucun réarrangement de grande taille de type délétion et/ou amplification n'a été détecté parmi les mutants Pig-pap. Ceci a été démontré par des expériences d'hybridation utilisant des cosmides révélant la région instable et par la comparaison de profils de macrorestriction obtenus en électrophorèse en champs pulsé (Martin *et al.*, 1999). Par ailleurs, au sein des catégories de mutants Pig-col et Pig-sec, une hétérogénéité phénotypique a été observée. Elles se manifestent notamment par une production plus ou moins importante de pigment et/ou d'antibiotiques. La très grande majorité de ces mutants sporule. Les mutants Pig-pap apparaissent au contraire comme une catégorie de mutants phénotypiquement homogènes. Ils présentent tous le même aspect colonial caractéristique et sont non sporulants. Les caractéristiques des mutants Pig-pap étant bien différentes des deux autres types de mutants, ils peuvent ainsi être considérés comme représentants d'un nouvel aspect de l'instabilité génétique. Ces mutants pourraient résulter soit d'événements d'instabilité n'impliquant que des réarrangements locaux de petites tailles soit de mutations ponctuelles donc plus discrètes. Quelle que soit l'hypothèse, ils représentent à ce titre un nouvel aspect de l'instabilité génétique, ce qui nous a conduits à les caractériser davantage.

2.2. Recherche de la nature moléculaire des mutants Pig-pap

2.2.1. Caractéristiques des mutants Pig-pap étudiés

Afin d'identifier la nature de la modification génétique qui conduit au phénotype Pig-pap, des essais de complémentation fonctionnelle ont été réalisés en introduisant dans les trois mutants analysés, pap1, pap2 et pap3, qui sont issus d'événements mutationnels indépendants, chacun des cinq gènes *whi* précoces (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ*) de *S. coelicolor*. L'observation en microscopie électronique à balayage des filaments aériens produits par les trois mutants a montré qu'ils sont bloqués tôt au cours du processus de sporulation puisqu'ils présentent un phénotype similaire à celui d'un mutant *whiG* de *S. coelicolor*. Seule l'introduction d'une copie de *whiG* chez ces mutants a permis le retour à l'aptitude à produire des spores et le pigment gris. De plus, l'introduction de ce gène chez trois mutants Pig-pap de *S. coelicolor*, PC1, PC2 et PC3, a permis également la restauration du phénotype sauvage.

Cependant, deux types d'observations sont distingués. Pour pap1 et pap2, les colonies des transconjugants obtenus après intégration de *whiG* apparaissaient légèrement moins pigmentées que celles de la souche sauvage et des transconjugants pap3(*whiG*), PC1(*whiG*), PC2(*whiG*) et PC3(*whiG*). *Cette différence de pigmentation correspond-elle à une quantité moindre de spores produites ? Ou à une quantité moindre de pigment produit par spore ?* En outre, en microscopie électronique à balayage, les spores apparaissaient moins arrondies, moins différenciées que celles d'une souche sauvage ou du transconjugant pap3(*whiG*). Il semblerait donc que pour les deux souches pap1 et pap2, l'introduction de *whiG* permet le retour à la sporulation et à la pigmentation mais une modification de nature encore inconnue empêcherait le déroulement complet du processus de sporulation et peut-être de la maturation des spores.

Par ailleurs, contrairement aux transconjugants pap3(*whiG*), PC1(*whiG*), PC2(*whiG*), PC3(*whiG*), les transconjugants pap1(*whiG*) et pap2(*whiG*) ne produisent pas de papilles blanches sur leurs colonies. Il semblerait que le phénomène de mutabilité qui affecte le transgène *whiG*, phénomène étudié dans pap3(*whiG*) ne soit pas présent dans l'autre catégorie de transconjugants. Cet état mutable ne serait donc pas mis en place ou activé chez les deux mutants pap1 et pap2. Ainsi, les mutants Pig-pap qui apparaissaient phénotypiquement

homogènes, seraient en fait hétérogènes. *Comment expliquer cette hétérogénéité ?* Les résultats de RT-PCR quantitative réalisée pour estimer le niveau de transcrits *whiG* ont montré que ce niveau de transcription était similaire entre les trois transconjugants, *pap1(whiG)*, *pap2(whiG)* et *pap3(whiG)*, ce qui permet de réfuter l'hypothèse d'une expression différentielle du transgène *whiG* pour expliquer la différence phénotypique obtenue suite à la complémentation. *La modification génétique qui aboutit au phénotype Pig-pap est-elle alors modulable entre les différents mutants ? Ou pap1 et pap2 présenteraient-ils, en plus par rapport à pap3, une autre modification tel un deuxième gène muté qui ne serait pas complémenté par introduction de whiG et qui empêcherait ainsi de mener à terme le processus de différenciation ?*

2.2.2. Le facteur σ^{WhiG} ne serait pas fonctionnel chez les mutants Pig-pap

Bien que l'introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor* chez les six mutants Pig-pap, *pap1*, *pap2*, *pap3*, *PC1*, *PC2* et *PC3* ait permis le retour à la pigmentation et à la sporulation, aucune mutation dans le gène *whiG* n'a été détectée chez ces mutants. Par ailleurs, l'analyse transcriptionnelle du gène *whiG* par RT-PCR quantitative a montré que le niveau de transcription de *whiG* chez les trois mutants de *S. ambofaciens* était similaire à celui estimé chez la souche sauvage. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de *whiG* pourrait être modifiée au niveau post-transcriptionnel chez ces trois mutants. Ainsi, comme l'approche permettant de détecter la protéine WhiG chez les mutants Pig-pap par une technique de Western-blot n'avait pas apporté de résultats interprétables, nous nous sommes intéressés à l'activité de σ^{WhiG} chez les mutants. Sachant d'une part, que le gène *whiG* de *S. ambofaciens* est très homologue au gène *whiG* de *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* et qu'il reconnaîtrait potentiellement de ce fait les mêmes séquences promotrices et, d'autre part, que les facteurs σ^{WhiG} de *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* régulent entre autres le gène *whiH* présent chez ces deux espèces, nous avons étudié la transcription de *whiH* chez les mutants Pig-pap. Il s'est avéré qu'aucun transcrit de ce gène n'a été détecté chez *pap1*, *pap2* et *pap3*. Puisque l'introduction du gène *whiH* de *S. coelicolor* dans les trois mutants Pig-pap caractérisés ne permet pas la restauration du phénotype sauvage, ce résultat suggère que σ^{WhiG} n'est pas fonctionnel chez les mutants Pig-pap.

2.2.2.1. Mécanismes de régulation de l'activité des facteurs σ

Les facteurs σ peuvent être régulés au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. La régulation de certains facteurs σ tel σ^S chez *E. coli* ou σ^{SigH} chez *S. coelicolor* implique des mécanismes assez complexes car plusieurs types de contrôle de l'activité peuvent intervenir en même temps et/ou suivant les conditions environnementales. Peu d'exemples de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des gènes codant des facteurs σ impliquant la stabilité de l'ARNm ou des régulations traductionnelles ont été étudiés chez les *Streptomyces*. En revanche, la régulation post-traductionnelle de l'expression des facteurs σ a été bien caractérisée notamment dans le processus de différenciation chez *B. subtilis* et les bactéries du genre *Streptomyces*. Le mécanisme le plus connu est l'interaction réversible entre un facteur σ et une protéine inhibitrice, le facteur anti- σ , ce dernier étant capable d'empêcher le facteur σ de se fixer au noyau de l'ARN polymérase (Brown & Hughes, 1995). Dans le but d'émettre des hypothèses sur le mode de régulation de σ^{WhiG} qui n'est actuellement pas connu, une synthèse des différents mécanismes de régulation de facteurs σ décrits chez différentes espèces bactériennes sera présentée dans les paragraphes suivants.

2.2.2.1.1. Régulation de l'activité d'un facteur σ par un facteur anti- σ

Les facteurs anti- σ connus jouent un rôle dans divers processus chez les bactéries, comme par exemple dans la biosynthèse de flagelles chez *S. typhimurium* en régulant le facteur σ^F , dans les fonctions extracytoplasmiques, dans la réponse générale aux stress en régulant σ^B de *B. subtilis* ou dans la réponse aux stress chez *S. coelicolor* en régulant le facteur σ^{SigH} . Par ailleurs, dans certains cas, les facteurs anti- σ peuvent être régulés par des facteurs anti-anti- σ (Bignell *et al.*, 2003). Chez *S. ambofaciens*, il a été montré récemment que le modèle de régulation des facteurs σ^{HasR} et σ^{HasL} (présentant 97 % d'identité en acides aminés), codés par deux gènes dupliqués, faisait intervenir les systèmes de régulation anti- σ /anti-anti- σ (Roth *et al.*, 2004). Ce modèle atteindrait un niveau de complexité élevé. Il est en effet envisagé que le facteur anti- σ qui présente 89 % d'identité avec le facteur anti- σ de σ^B de *S. coelicolor* (Cho *et al.*, 2001), codé par *prsR* et dont l'activité serait régulée chez *S. ambofaciens* par le facteur anti-anti- σ codé par *arsR*, régule à la fois les facteurs σ^{HasR} et

σ^{HasL} (figure 38). De la même façon, le facteur anti- σ PrsL, présentant 43 % d'identité avec un facteur anti- σ dont le gène est situé en aval de *sigL* qui code un facteur σ présentant 71 % d'identité avec σ^{HasL} , pouvait aussi bien réguler l'activité de σ^{HasL} que celle de σ^{HasR} . De plus, ces facteurs anti- σ ne présenteraient pas la même affinité pour chacun des deux facteurs σ (Roth *et al.*, 2004).

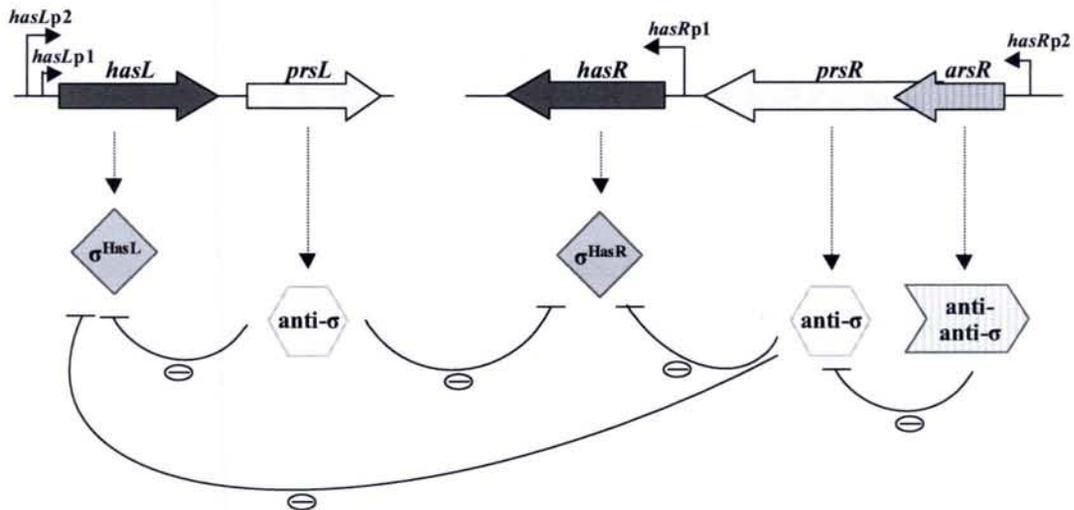


Figure 38 :

Modèle de régulation des facteurs σ^{HasL} et σ^{HasR} faisant intervenir un système de régulation anti- σ /anti-anti- σ (d'après Roth *et al.*, 2004). Les gènes *hasL* et *prsL* dont la transcription dépend des promoteurs *hasLp1* et *hasLp2* sont situés sur le bras chromosomique gauche. Le gène *hasR* dont la transcription dépend du promoteur *hasRp1* et les gènes *prsR* et *arsR* dont la transcription dépend du promoteur *hasRp2* sont situés sur le bras chromosomique droit. Sur la figure sont indiqués les effets inhibiteurs (\ominus) de chaque facteur.

2.2.2.1.2. Régulation de l'activité d'un facteur σ par dégradation protéolytique

La dégradation protéolytique est un mécanisme de contrôle de l'activité de régulateurs tels les facteurs σ impliqués principalement dans la différenciation cellulaire chez les bactéries. Les protéines présentant une série d'acides aminés non polaires à leur extrémité C-terminale sont labiles et peuvent être rapidement dégradées par des protéases spécifiques (Gottesman, 1999). Chez *E. coli*, le facteur σ^{32} régulant la réponse au choc thermique est la cible de la protéase FtsH (Herman *et al.*, 1995). Dans cet exemple, la dégradation du facteur σ^{32} par la protéase est favorisée par la fixation du complexe chaperonique DnaJ et DnaK-GrpE sur σ^{32} qui inhibe sa liaison à l'ARN polymérase et le rend ainsi plus vulnérable à la

dégradation (Tatsuta *et al.*, 2000). Lors d'un choc thermique, la transcription de *rpoH* codant le facteur σ^{32} est fortement activée, ce qui conduit à la production de protéines dénaturées par ce facteur. Ainsi, les protéines chaperonnes se fixent préférentiellement sur les autres protéines dénaturées et ne se fixent plus spécifiquement sur σ^{32} . Chez les bactéries, différentes familles de protéases ATP-dépendantes ont été identifiées : Clp, HslUV, FtsH et Lon (Gottesman, 1996). Chez *S. coelicolor*, les gènes codant la sous-unité catalytique ClpP et les gènes codant les sous-unités régulatrices ClpX et ClpC de la famille des protéases Clp ATP-dépendant ont été identifiés (de Crecy-Lagard *et al.*, 1999). Le génome de *S. coelicolor* comporte cinq gènes *clpP*, deux gènes *clpC* et un gène *clpX*. Ces protéases sont capables de dégrader certains régulateurs à différents temps du processus de différenciation. Par ailleurs, ces complexes protéasiques ont été impliqués dans la régulation de la différenciation morphologique et métabolique des *Streptomyces* (Viala & Mazodier, 2003 ; de Crecy-Lagard *et al.*, 1999). Le mutant *clpP1* présente une déficience dans la formation du mycélium aérien et présente un phénotype *bld*. Par ailleurs, la surexpression de ce gène accélère le processus de différenciation et celle de *clpX* augmente la production d'antibiotiques (de Crecy-Lagard *et al.*, 1999). Dans la cascade complexe de régulation de la différenciation chez les *Streptomyces*, il existerait donc un contrôle impliquant une dégradation protéolytique d'un régulateur tel un facteur σ . Chez *S. coelicolor*, en amont du gène *sigL* codant un facteur σ intervenant dans la réponse aux stress ont été mis en évidence deux ORF qui coderaient deux nouvelles formes de la sous-unité ClpP (ClpP3/ClpP4) (Viala *et al.*, 2000).

2.2.2.1.3. Régulation de l'activité d'un facteur σ par production d'un facteur pro- σ

La régulation de l'expression génique pendant la différenciation des endospores chez *B. subtilis* implique l'activation séquentielle d'une cascade de facteurs σ (Kroos *et al.*, 1999). La succession de l'activation des facteurs σ conduit à la formation de deux compartiments cellulaires, la cellule mère et l'endospore. L'activité des différents facteurs σ est contrôlée à différents niveaux comme par exemple lors de la synthèse du facteur σ sous forme inactive, appelé pro- σ . Ainsi, l'activation résulte de la maturation par protéolyse des facteurs pro- σ inactifs en facteurs σ actifs. En général, l'activation s'effectue par clivage d'une vingtaine d'acides aminés à l'extrémité N-terminale. C'est le cas par exemple pour les facteurs σ^E et σ^K exprimés exclusivement dans la cellule mère (McBride & Haldenwang, 2004). Chez *Streptomyces*, le facteur σ^R qui joue un rôle dans la réponse au stress oxydant est synthétisé

sous forme d'un facteur pro- σ de 227 acides aminés. Il devient actif par perte des quatre premiers résidus de l'extrémité N-terminale (Paget *et al.*, 1998).

2.2.2.1.4. La régulation de *rpoS* chez *E. coli*, un exemple de régulation impliquant des mécanismes complexes

Chez *E. coli*, le facteur σ^S (ou σ^{38}) codé par le gène *rpoS* contrôle un grand nombre de gènes (au moins 50) impliqués dans la réponse cellulaire à diverses conditions de stress comme une carence nutritionnelle, un choc osmotique, un choc acide, un choc thermique, un dommage oxydant à l'ADN ou lors du passage en phase stationnaire (Hengge-Aronis, 2002). La synthèse et l'accumulation de σ^S sont sous le contrôle d'un panel de mécanismes qui affectent les processus de transcription, de traduction, de protéolyse et de la formation du complexe holoenzyme $E\sigma^S$ (Lange & Hengge-Aronis, 1994). Le contrôle de la transcription du gène *rpoS* nécessite le ppGpp, du polyphosphate et un régulateur positif à deux composants nommé BarA et une protéine réceptrice de l'AMPc (CRP-AMPc) comme régulateur négatif (Kolb *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 2000). La traduction de l'ARNm *rpoS* est contrôlée par une cascade de facteurs interagissant entre eux incluant les protéines Hfq, H-NS, l'ARN antisens *drsA*, la protéine LeuO et l'ARN antisens *oxyS* qui semblent moduler la stabilité de la structure secondaire d'une région située au niveau du site de liaison du ribosome sur l'ARNm de *rpoS*. Par ailleurs, le facteur σ^S est sensible à la protéolyse par ClpPX, réaction favorisée par la présence de la protéine RssB et inhibée par la protéine chaperonne DnaK (Becker *et al.*, 2000; Gottesman, 1996). Enfin, cette activité peut aussi être modulée par le tréhalose et le glutamate qui activent la formation de l'holoenzyme et favorisent ainsi la liaison de cet holoenzyme à certains promoteurs. Cette holoenzyme est capable de reconnaître deux types de séquences promotrices : des promoteurs spécifiques à σ^S (régulons des gènes impliqués dans la réponse aux stress) et des promoteurs reconnus également par σ^{70} (Tanaka *et al.*, 1995). Il a été montré qu'à l'entrée en phase stationnaire, une nouvelle protéine, l'anti- σ Rsd, est produite et inhibe spécifiquement l'activité de σ^{70} , ce qui permet d'augmenter l'affinité de σ^S pour l'ARN polymérase et favorise la transcription des gènes régulés par σ^S (Jishage & Ishihama, 1998).

2.2.2.1.5. La régulation de *sigH* chez *S. coelicolor*, un exemple de régulation impliquant des mécanismes complexes

Le facteur σ^{SigH} chez *S. coelicolor* joue un rôle dans la réponse au choc osmotique et thermique. Il a été montré que sa régulation faisait intervenir différents mécanismes dont un contrôle transcriptionnel et traductionnel, une dégradation protéolytique et l'activité d'un facteur anti- σ (Viollier *et al.*, 2003). Tout d'abord, il a été montré que la transcription de *sigH* était réprimée par la protéine BldD uniquement pendant la phase végétative (Kelemen *et al.*, 2001). SigH peut s'accumuler sous trois isoformes : σ^{37} , σ^{51} et σ^{52} . En fait, ce gène contient trois sites indépendants d'initiation à la traduction (Viollier *et al.*, 2003). L'accumulation des trois isoformes de SigH est corrélée au développement morphologique de la bactérie. Au cours du temps, les isoformes σ^{51} et σ^{52} s'accumulent en phase exponentielle dans une culture en milieu liquide et au début de la formation du mycélium végétatif lors d'une culture en milieu solide. Ensuite, ces deux isoformes disparaissent. Cette disparition est corrélée d'une part, au début de l'accumulation de l'isoforme σ^{37} en phase stationnaire ou pendant la différenciation du mycélium aérien et d'autre part, à l'apparition de deux nouveaux produits de 34 kDa et 38 kDa qui correspondraient à des dérivés protéolytiques des facteurs σ^{51} et σ^{52} . En résumé, en plus d'une régulation transcriptionnelle de *sigH* par BldD, l'expression de ce gène est régulée au niveau post-transcriptionnel par une traduction différentielle des différentes isoformes par une utilisation différentielle des codons start, une protéolyse clivant σ^{51} et σ^{52} en deux dérivés protéolytiques et par l'activité inhibitrice du facteur anti- σ nommé PrsH capable d'inhiber l'activité des trois isoformes du facteur σ^{SigH} (Viollier *et al.*, 2003).

2.2.2.2. Hypothèses sur le mode de régulation du facteur σ^{WhiG} chez *Streptomyces*

La séquence en acides aminés du facteur σ^{WhiG} codé par le gène *whiG* est homologue (environ 40 % d'identité) aux séquences de σ^{D} de *B. subtilis* et σ^{F} (ou σ^{FliA}) d'*E. coli* et *S. typhimurium*, facteurs σ régulant la transcription de gènes impliqués dans la mobilité et le chimiotactisme de ces bactéries (Arnosti & Chamberlin, 1989; Ohnishi *et al.*, 1990). Il a été montré que σ^{WhiG} pouvait compléter un mutant *fliA* n'exprimant plus σ^{FliA} chez *S. typhimurium* (Chater *et al.*, 2001). Un homologue à σ^{WhiG} est retrouvé chez différentes espèces de *Streptomyces* (voir figure 3 de l'article n°2). Dans ce travail, la séquence de *whiG*

de *S. ambofaciens* a été déterminée et cette séquence a été comparée avec celle des autres espèces de *Streptomyces* (*S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseocarnum* et *S. aureofaciens*). Ainsi, nous avons pu montrer, entre autres, que les régions 2.4 et 4.2 de la protéine WhiG de *S. ambofaciens*, de *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* sont parfaitement conservées, ce qui suggère très fortement que σ^{WhiG} de *S. ambofaciens* reconnaît les mêmes séquences promotrices que celles des autres σ^{WhiG} . Par différentes méthodes de recherche, plusieurs séquences promotrices reconnues par les facteurs σ^{WhiG} de *S. coelicolor* et de *S. aureofaciens* ont été identifiées (Novakova *et al.*, 1998; Tan & Chater, 1993; Ainsa *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1993; Ryding *et al.*, 1999; Kormanec *et al.*, 1999; Kormanec *et al.*, 2001). Parmi les gènes régulés par σ^{WhiG} , le gène *whiH* codant une protéine régulatrice de type répresseur et impliquée dans la cascade de régulation pour la sporulation est retrouvé chez *S. coelicolor* et *S. aureofaciens*. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur la transcription de ce gène pour l'étude de l'activité de σ^{WhiG} chez *S. ambofaciens*.

Le gène *whiG* de *S. coelicolor* présente une transcription constitutive à partir d'un site unique de transcription (Kelemen *et al.*, 1996). Chez cette bactérie, un transcrite de *whiG* a été détecté par RT-PCR à différents temps du cycle de développement, c'est-à-dire pendant la croissance du mycélium végétatif, du mycélium aérien et de la sporulation. Néanmoins, σ^{WhiG} présente une activité uniquement pendant les phases tardives du cycle de développement. En fait, la transcription des gènes *whiH* et *whiI*, qui dépend de σ^{WhiG} , est régulée temporellement. Elle est déclenchée au début de la différenciation du mycélium aérien (Ainsa *et al.*, 1999; Ryding *et al.*, 1999). Ainsi, l'expression de σ^{WhiG} serait régulée au niveau post-transcriptionnel. Bien que ce facteur σ présente des similitudes avec σ^{FlhA} régulé par le facteur anti- σ FlgM chez *S. typhimurium* (Ohnishi *et al.*, 1992), aucun homologue du gène *flgM* n'a été retrouvé dans le génome entièrement séquencé de *S. coelicolor* (www.sanger.ac.uk/Projects/S.coelicolor). L'activité de σ^{WhiG} pourrait être régulée par un facteur anti- σ différent de FlgM mais elle pourrait également être régulée par d'autres mécanismes, par exemple par production d'un ARN antisens comme pour le facteur σ^{S} ou par protéolyse. La protéine WhiG n'ayant jamais été détectée sur des profils de Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques de ce facteur σ , la présence de σ^{WhiG} sous les formes de pro- σ^{WhiG} putatif et inactif et de σ^{WhiG} actif, n'a, à ce jour, jamais pu être mise en évidence. Pour la régulation de ce facteur σ , il a toutefois été montré que la transcription de *whiG* au début de la croissance du mycélium végétatif et jusqu'au début de la formation du mycélium

aérien était réprimée par le facteur transcriptionnel nommé BldD (Elliot & Leskiw, 1999). Un site de liaison de BldD au niveau de la séquence promotrice de *whiG* a été mis en évidence. Comme les gènes *rpoS* ou *sigH*, le gène *whiG* semble présenter une régulation complexe impliquant différents mécanismes et qui reste à ce jour indéterminée.

2.2.2.3. Hypothèses sur la nature moléculaire du déterminisme du phénotype Pig-pap

Les trois mutants Pig-pap de *S. ambofaciens* et les trois de *S. coelicolor* analysés dans ce travail peuvent être complétés par introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor* et pourtant la séquence *whiG* endogène est identique à celle des souches sauvages, WT8 pour *S. ambofaciens* et M145 pour *S. coelicolor*. Par ailleurs, nous avons détecté la présence d'un transcrit *whiG* pour un mutant de *S. ambofaciens* testé comme pour la souche sauvage à différents temps au cours du cycle de développement. En outre, à 48 heures de croissance, ce qui correspond au début de la formation du mycélium aérien, le taux de transcrit *whiG* pour les trois mutants de *S. ambofaciens* estimé par RT-PCR en temps réel n'est pas significativement différent de celui de la souche sauvage WT8. Ainsi, la modification qui conduirait au phénotype Pig-pap ne correspondrait ni à une mutation dans le gène *whiG* ni à une modification au niveau transcriptionnel de ce gène. Or, le gène *whiH* régulé par σ^{WhiG} chez *Streptomyces* n'est pas transcrit chez les mutants Pig-pap. Etant donné que l'introduction du gène *whiH* dans les trois mutants n'a pas restauré le phénotype sauvage, cela suggère très fortement que cette absence de transcription ne résulte pas d'une mutation mais qu'il s'agirait plutôt d'un problème d'expression de σ^{WhiG} . Toutefois, pour valider ces conclusions, il serait intéressant de tester la transcription d'autres gènes régulés par σ^{WhiG} tels les gènes *whiI* ou *orfTH4* de *S. coelicolor* (Ainsa *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1998)).

Ainsi, pour expliquer le phénotype Pig-pap, une modification post-transcriptionnelle affectant soit la traduction (par exemple, présence d'un ARN antisens) soit l'activité de σ^{WhiG} (par exemple, activité protéolytique, présence de facteurs anti- σ ou anti-anti- σ potentiels) peut être envisagée.

Dans le premier cas, la protéine WhiG ne pourrait plus être produite (figure 39). Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de détecter la protéine WhiG dans les différentes

souches par la technique de Western-blot utilisant des anticorps anti-WhiG. Les résultats préliminaires n'ayant pas permis de détecter cette protéine même pour la souche sauvage, il serait toutefois intéressant de poursuivre cette expérience en utilisant d'autres anticorps.

Dans le deuxième cas, il est envisagé que l'ARNm *whiG* serait traduit mais la protéine ne serait pas fonctionnelle (figure 39). La protéine WhiG pourrait être produite sous forme de pro- σ^{WhiG} et ce facteur σ deviendrait actif par perte de l'extrémité N-terminale. Dans ce cas, nous pourrions envisager qu'un tel clivage peut ne pas avoir lieu dans un mutant Pig-pap pour des raisons indéterminées. L'expression de *whiH* étant transitoire, la protéine WhiG pourrait être produite mais dégradée par une protéase avant le déclenchement du processus de différenciation du mycélium aérien et dans les étapes plus tardives du processus de sporulation, c'est-à-dire lorsque ce facteur σ n'est pas fonctionnel. L'approche protéique par une technique de Western-blot, décrite précédemment, pourrait par exemple nous permettre de révéler la présence de dérivés protéolytiques dans le cas où WhiG serait soumise à une telle régulation. Dans l'hypothèse d'une protéolyse qui serait assurée, par exemple, par une protéine de type Clp ATP-dépendante, une souche surproduisant cette activité protéolytique devrait présenter un phénotype « *whiG-like* ». Par ailleurs, dans le cas d'une déficience dans l'activité protéolytique, le facteur σ^{WhiG} pourrait être actif plus tôt au cours du développement de la colonie, ce qui aboutirait à une sporulation de type ectopique se traduisant par la formation de spores au début de la croissance du mycélium végétatif. Contrairement à cette hypothèse, il a été montré chez *S. lividans* et *S. coelicolor* qu'un mutant *clpPI* présentait un phénotype *bld* (de Crecy-Lagard *et al.*, 1999). *Un autre type de protéase serait-il impliqué ?* Cependant, dans un contexte Pig-pap, l'hypothèse d'une déficience dans une activité protéolytique putative de σ^{WhiG} semble peu probable. En effet, si tel était le cas, le seul fait d'introduire une nouvelle copie de *whiG* dans les souches mutantes ne peut pas expliquer la restauration du phénotype sauvage puisque la complémentation de la déficience de la protéase ou d'un autre régulateur et par conséquent l'activation de σ^{WhiG} n'aurait en fait pas lieu.

Comment expliquer le phénotype Pig-pap en impliquant une déficience dans un facteur anti- σ ? Dans un contexte Pig-pap, une modification dans l'activité du facteur anti- σ ou dans sa structure pourrait empêcher la libération du facteur σ donc la liaison de ce facteur sur l'ARN polymérase et par conséquent le déclenchement du processus de différenciation du mycélium aérien. La nature du mécanisme impliqué dans l'inactivation du facteur anti- σ et le

mode de séquestration du facteur σ par le facteur anti- σ restent à déterminer. Dans une souche mutante complétée par introduction de *whiG*, si la production d'un facteur anti- σ muté est limitée par une auto-régulation potentielle, le facteur σ^{WhiG} produit par le transgène *whiG* de *S. coelicolor* pourrait éviter la séquestration d'un tel facteur anti- σ et pourrait ainsi se lier au noyau de l'ARN polymérase, ce qui permettrait à l'holoenzyme d'être fonctionnelle. L'hypothèse de la régulation de σ^{WhiG} par un facteur anti- σ pourrait être testée en recherchant dans le génome entièrement séquencé de *S. coelicolor* des gènes qui coderaient potentiellement un homologue à un facteur anti- σ . L'introduction d'un de ces gènes dans un mutant Pig-pap pourrait permettre la restauration du phénotype sauvage.

Comment expliquer le phénotype Pig-pap en impliquant une déficience dans un facteur anti-anti- σ ? Chez *Streptomyces*, l'activité du facteur σ^{WhiG} pourrait être inhibée par la liaison d'un facteur anti- σ lui-même inhibé par la liaison d'un facteur anti-anti- σ . Dans ce cas, une mutation dans un tel facteur anti-anti- σ conduirait à l'activation constitutive du facteur anti- σ qui empêcherait la libération du facteur σ . Ainsi, comme décrit précédemment, la complémentation de la déficience d'une telle mutation par introduction d'une copie de *whiG* supplémentaire dans les souches mutantes pourrait être expliquée. Dans ce cas, nous pourrions envisager des essais de complémentation du phénotype mutant Pig-pap par introduction de gènes homologues à des facteurs anti-anti- σ .

De plus, le criblage d'une banque d'ADN génomique de la souche sauvage de *S. ambofaciens* en introduisant différents plasmides ou cosmides recombinants dans un mutant Pig-pap pourrait permettre, par complémentation du phénotype mutant, de sélectionner soit le gène *whiG* de *S. ambofaciens* car son intégration dans le génome du mutant restaure le phénotype sauvage soit un gène codant un facteur anti- σ ou un facteur anti-anti- σ ou une autre fonction qui serait muté chez les Pig-pap.

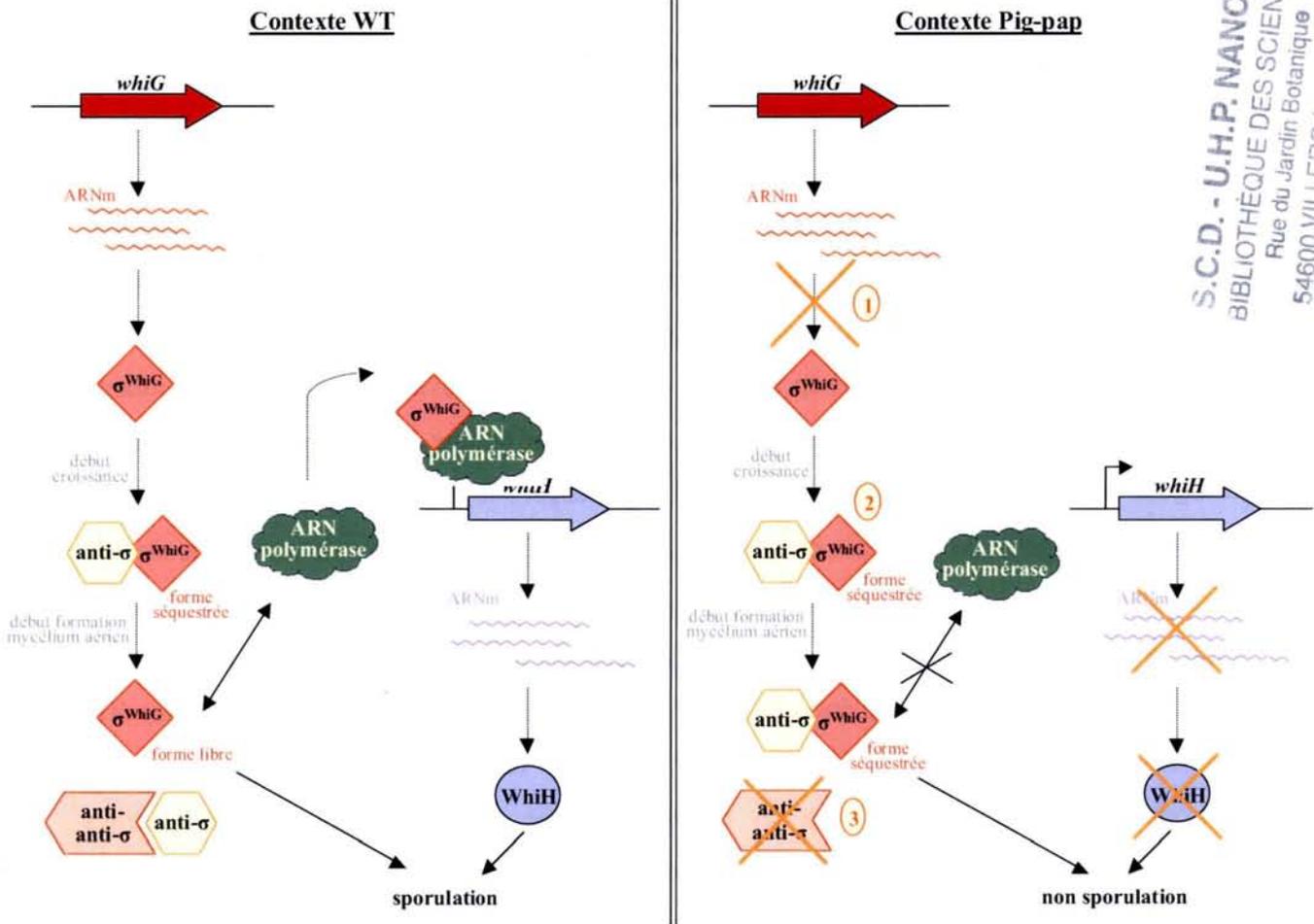


Figure 39 :

Modèle putatif de la régulation de *whiG* chez la souche sauvage et chez les mutants Pig-pap de *S. ambofaciens*. Dans un contexte sauvage, le facteur σ^{WhiG} codé par *whiG* est exprimé tout au long du cycle de développement. Cependant, son activité serait inhibée par la liaison d'un facteur anti- σ jusqu'au début de la formation du mycélium aérien, moment où un facteur anti-anti- σ interviendrait. Ainsi, le facteur σ^{WhiG} sous forme libre peut se lier à l'ARN polymérase et ce complexe active notamment la transcription du gène *whiH*. La protéine *WhiH* fait partie de la cascade de régulation qui conduit à la sporulation. Le facteur σ^{WhiG} régule aussi d'autres gènes dont le produit est nécessaire à ce processus. Dans un contexte Pig-pap, plusieurs hypothèses d'inactivation de *WhiG* sont envisagées. La première (1) serait une modification qui aurait lieu pendant la traduction de l'ARNm *whiG*, ce qui conduirait à la non production de la protéine. La deuxième (2) serait une modification au niveau du facteur anti- σ qui séquestrerait la protéine *WhiG*. La troisième (3) serait une modification dans le facteur anti-anti- σ putatif qui ne pourrait plus inhiber l'activité du facteur anti- σ . Dans ce cas, le facteur σ^{WhiG} resterait séquestré. Dans tous les cas, le facteur σ^{WhiG} , n'étant jamais sous forme libre, ne peut se fixer à l'ARN polymérase et activer les gènes cibles.

2.3. Une mutabilité ciblée?

Pour le mutant *pap3* de *S. ambofaciens* et les trois mutants PC1, PC2 et PC3 de *S. coelicolor* testés, l'intégration du gène *whiG* de *S. coelicolor* dans leur génome a permis la restauration de la sporulation, de la pigmentation ainsi que de la production de papilles blanches sur les colonies. La caractérisation phénotypique et moléculaire de dix papilles issues d'événements mutationnels indépendants et isolées sur le transconjugant *pap3(whiG)* a révélé plusieurs particularités. Au niveau phénotypique, les mutants issus de ces papilles sont similaires aux trois mutants Pig-pap analysés au cours de ce travail. Au niveau moléculaire, aucun réarrangement de grande taille n'a été détecté. Par contre, le séquençage entrepris du transgène *whiG* chez les cinq mutants qui portaient encore le plasmide intégré au niveau du site *attB* du phage ϕ C31 a permis de mettre en évidence différents types de mutations au sein du transgène. Il s'agit de mutations de type frameshift ou délétions. Ainsi, le transgène *whiG* serait une cible mutationnelle pour différents événements d'instabilité génétique, une perte de plasmide (5 cas sur 10), une délétion (1 cas sur 10) ou une mutation frameshift (4 cas sur 10). Ces observations valident le fait que la restauration du phénotype sauvage résulte de l'introduction du gène *whiG* chez les mutants puisque son extinction dans les papilles observées sur le transconjugant fait disparaître le phénotype de complémentation. Ces résultats montrent que l'inactivation du transgène *whiG* est de nature mutationnelle.

Quelle est la nature de ce phénomène mutationnel qui semble cibler le transgène whiG ? En fait, il serait intéressant de vérifier si cette mutabilité est bien ciblée au transgène *whiG* ou si elle est généralisée. Par exemple, nous pourrions séquencer une région en amont et en aval du transgène *whiG*, c'est-à-dire une partie du plasmide pSET152, chez ces mutants afin de détecter potentiellement des mutations si cette mutabilité n'est pas ciblée. Par ailleurs, cette mutabilité serait mise en place à un stade précis du cycle de développement. En effet, cette mutabilité qui affecterait le transgène *whiG* correspond principalement à la génération de mutants détectés sous forme de papilles au sein de la colonie. Aucun mutant Pig-col et peu de colonies avec un secteur dépigmenté ont été observés. Ainsi, il apparaît que cette mutabilité soit spécifique à la formation du mycélium aérien car les papilles sont générées au cours de cette étape.

*Pourquoi aucun des mutants sélectionnés ne présentent une modification de type post-transcriptionnel de l'expression de *whiG* comme ce qui a été décrit dans les mutants Pig-pap dits de première génération ? Pourquoi semble-t-on observer deux phénomènes mutationnels différents, un à l'origine des mutants Pig-pap de première génération et un autre expliquant le phénotype Pig-pap observé sur les transconjugants ?*

Les mutants Pig-pap produits à haute fréquence au sein d'une colonie pourraient-ils conférer un avantage pour la colonie ? La formation de papilles est-elle une nécessité ? En effet, le fait que les transconjugants forment également des papilles alors qu'ils possèdent une copie supplémentaire du gène *whiG* suggère que la formation des papilles pourrait être indispensable au développement de la colonie. Le cycle de différenciation d'une colonie de *Streptomyces* est un processus complexe qui aboutit à une structure hautement organisée (Chater, 1998). Outre le fait que la formation du mycélium aérien ait lieu suite à un stress (Kelemen *et al.*, 2001), la lyse du mycélium végétatif lors du développement du mycélium aérien chez *Streptomyces* implique un processus de mort cellulaire programmée lors de la formation de la colonie (Ohnishi *et al.*, 2002). Dans un tel contexte, la capacité à former des papilles non sporulantes pourrait conférer un avantage adaptatif à la colonie. Cet avantage pourrait correspondre à une économie de l'énergie nécessaire à la sporulation ou au développement d'un métabolisme différent, aboutissant par exemple à la synthèse de nouvelles substances. La papille peut ainsi être considérée comme une forme de sénescence qui reste viable en conditions de laboratoire.

3. Modulation de la dynamique mutationnelle chez *S. ambofaciens*

3.1. Les mutants Pig-pap sont issus de niveaux variés d'instabilité génétique

3.1.1. Notion d'état mutateur

Le travail de thèse de Patricia Martin réalisé au laboratoire avait porté sur la mise en évidence d'un polymorphisme intraspécifique et intraclonal entre différents sous-clones sauvages de *S. ambofaciens* ATCC23877 (Martin, 2000). Douze colonies de phénotype sauvage ont été arbitrairement choisies dans la descendance de la souche *S. ambofaciens* ATCC23877 et l'instabilité génétique a été étudiée dans chacune de ces douze populations. Il a été observé, qu'après quatorze jours de croissance sur milieu HT solide, que la majorité des colonies (environ 70 %) présentaient à leur surface des papilles blanches en nombre variable et que les fréquences de colonies dépigmentées et de colonies pigmentées à secteurs dépigmentés variaient significativement d'une population à l'autre (Martin *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré que le caractère nombre de papilles par colonie était un caractère héritable. En effet, une colonie à faible nombre de papilles produit majoritairement des colonies avec peu de papilles (entre 1 et 5) tandis que des colonies à grand nombre de papilles, à plus de 20 papilles, qualifiées alors de colonies hyperpap produisent majoritairement des colonies à très grand nombre de papilles (>20). De plus, ces colonies hyperpap, qualifiées de souches mutatrices, produisent à très haute fréquence des mutants Pig-col (en moyenne 20 % contre en moyenne 3 % pour les clones sauvages) et plus de papilles dépigmentées. Ainsi, ces souches présentent un niveau d'instabilité génétique plus élevé que les sous-clones sauvages. L'état mutateur pourrait être généré par une modification génétique de nature quantitative, modification qui se mettrait en place pendant la différenciation de la colonie. *Ainsi, il est intéressant de se demander si les mutants Pig-pap qui résultent de niveaux variés d'instabilité génétique sont eux-mêmes dans un état mutateur.*

3.1.2. Hypothèses sur la nature de l'état mutateur chez les mutants Pig-pap

S'agit-il d'un état mutateur spécialisé ?

Dans le cas d'un état mutateur spécialisé, nous pourrions envisager qu'un gène impliqué dans la régulation de σ^{WhiG} tel un facteur anti- σ ou un facteur anti-anti- σ serait un gène cible de cette mutabilité. Les mécanismes impliqués dans la mutabilité de ces gènes peuvent être nombreux (voir introduction). Parmi les différentes hypothèses, certaines permettent de supposer que le phénotype mutant soit réversible à haute fréquence. Cela pourrait être le cas si ce gène présentait un site d'intégration et d'excision d'un élément transposable à haute fréquence. Ce serait également le cas si la cible subissait des événements de recombinaison de type variation de phase. Or, le phénotype mutant Pig-pap apparaît stable. En effet, pour les trois mutants Pig-pap testés, nous avons estimé le taux de réversion vers le phénotype sauvage inférieur à 2.10^{-5} . De plus, à ce jour, aucune colonie observée dans la descendance de mutants Pig-pap ne présentait de papilles grises qui correspondraient à un retour, au cours de la différenciation du mycélium aérien, au phénotype sauvage.

S'agit-il d'un état mutateur généralisé ?

Dans le cas d'un état mutateur généralisé qui serait mis en place au cours de la différenciation du mycélium aérien, de nombreux caractères phénotypiques devraient être mutés. Les mutants Pig-pap ont été sélectionnés par leur phénotype observable, l'absence de pigmentation. *Présentent-ils d'autres caractères touchés par la mutabilité ?* Seuls les caractères pigmentation et sporulation semblent être mutés à haute fréquence chez les mutants Pig-pap. En effet, aucune augmentation de la fréquence de mutants auxotrophes ou de mutants résistants aux antibiotiques tels la rifampicine, le thiostrepton ou la streptomycine n'a été observée (Martin, 2000). Cependant, d'autres caractères qui n'incluent pas les processus de sporulation et de pigmentation peuvent être mutés pendant le développement de la colonie. Il serait ainsi intéressant de rechercher la présence potentielle d'autres gènes mutés au cours du développement de *S. ambifaciens*. Par exemple, il serait possible de construire un vecteur pouvant s'intégrer aléatoirement dans le génome de *Streptomyces* et qui comporterait un gène présentant une mutation frameshift. Après intégration de ce vecteur, des révertants de cette mutation seraient recherchés et caractérisés. Cette approche permettrait donc de savoir si

d'autres endroits du génome peuvent être affectés par cette mutabilité, suggérant la mise en place chez *Streptomyces* d'un état mutateur généralisé.

3.2. Induction de la mutabilité par une carence en nutriments

3.2.1. **La réponse stringente est impliquée dans la formation de papilles blanches sur les colonies**

L'analyse des distributions du nombre de papilles par colonie sur différents milieux dérivés du milieu HT variant par la quantité en nutriments a montré que lorsque le milieu de culture comporte en concentrations limitées des acides aminés, la production de papilles à la surface des colonies est exacerbée. La quantité d'acides aminés dans le milieu est donc un modulateur de l'instabilité génétique chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. La réponse stringente est induite en réponse à une limitation en acides aminés et est connue pour intervenir dans les mécanismes de différenciation et de mort cellulaire programmée (Lewis, 2000). Nous avons établi dans ce travail que la réponse stringente est impliquée dans la formation des papilles chez *Streptomyces*. En effet, il a été montré que les colonies d'un mutant *relA* de *S.coelicolor*, mutant ne produisant plus de ppGpp, ne présentent pas ou très peu de papilles à leur surface, sur milieu HT et sur milieu pauvre en acides aminés. La complémentation de ce mutant par induction de l'activité ppGpp synthétase permet le retour à la production importante de papilles blanches sur les colonies. Cela montre bien qu'il existe un lien direct entre l'état physiologique de la bactérie dû à un environnement particulier et l'augmentation de la mutabilité.

3.2.2. **Hypothèses sur la nature de la relation entre réponse stringente et mutabilité**

Le ppGpp régule l'activité de certains gènes en se fixant sur l'ARN polymérase et peut également jouer un rôle dans la compétitivité entre facteurs σ pour l'accès à l'ARN polymérase (Jishage *et al.*, 2002). La synthèse de ppGpp est induite lors de certains stress dont la carence nutritionnelle et lors de l'entrée en phase stationnaire (Chatterji et Ojha, 2001). Chez *Streptomyces*, le ppGpp qui serait ainsi produit au début de la différenciation du

mycélium aérien serait, au moins en partie, à l'origine de la formation de mutants Pig-pap, mutants produits à ce stade du cycle de développement.

La caractérisation moléculaire des mutants issus de papilles isolées sur des colonies cultivées sur milieu carencé en bacto-tryptone a révélé que les mutants WT8pap1 et WT12pap5 de *S. ambofaciens* présentaient une mutation dans le gène *whiG*. Dans le cas de WT8pap1, la séquence du gène *whiG* étant entièrement établie, une telle mutation conduit à la production d'une protéine non fonctionnelle puisque la région 4 de ce facteur sigma est absente. Aucune mutation n'a été détectée dans le gène *whiG* pour le mutant cp4 de *S. coelicolor*, mutant également généré lors de la réponse stringente. Pour les autres mutants, ce gène est en cours de séquençage. Les mutants Pig-pap seraient ainsi générés par deux mécanismes, l'un affectant la régulation post-transcriptionnelle de ce gène et l'autre affectant le gène *whiG*. Les six mutants de *Streptomyces* analysés, obtenus après culture sur milieu HT, semblent être affectés au niveau post-transcriptionnel. Deux mutants de *S. ambofaciens*, obtenus sur milieu HT carencé, présentent une mutation dans le gène *whiG*. *Ce type de mutation génique est-il observé spécifique chez des mutants produits par la réponse stringente ? Ou les mutants Pig-pap peuvent-ils être générés par différents mécanismes dont celui déclenché par la réponse stringente ?* Afin de répondre à ces questions, il serait envisageable d'utiliser une approche globale permettant d'analyser la séquence de *whiG* d'un plus grand échantillon de mutants Pig-pap produits après culture soit sur milieu HT soit sur milieu HT carencé pour lequel la réponse stringente est déclenchée. Par exemple, par une technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), il est possible de détecter une mutation frameshift ou une délétion dans le gène *whiG*. Cette technique présente l'avantage de tester rapidement un grand nombre de mutants.

Le ppGpp, agit-il directement sur la régulation de σ^{WhiG} ? Par exemple, l'interaction du ppGpp avec l'ARN polymérase pourrait modifier l'affinité de la liaison de σ^{WhiG} sur l'ARN polymérase et pourrait ainsi empêcher la formation de l'holoenzyme, ce qui aboutirait au phénotype Pig-pap. Cependant, cette hypothèse semble peu plausible étant donné qu'une telle modification de l'expression est transitoire et ne peut expliquer l'héritabilité du phénotype Pig-pap. Effectivement, l'isolement d'une papille blanche sur la colonie donne naissance à un mutant présentant un phénotype totalement dépigmenté. De ce fait, l'hypothèse

d'une compétition entre le σ^{WhiG} et un autre facteur σ est également à écarter. Ainsi, un mécanisme impliquant une mutation doit être envisagé.

Le ppGpp peut également augmenter la transcription de certains gènes et peut par conséquent augmenter leur mutabilité (Wright, 2000).

Ainsi, dans le cas des mutants Pig-pap affectés au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de *whiG*, le ppGpp pourrait augmenter la fréquence de mutations dans un gène dont le produit serait impliqué dans la régulation de σ^{WhiG} . D'après le modèle de régulation de *whiG* chez *Streptomyces*, proposé dans cette thèse, il pourrait s'agir par exemple d'un facteur anti- σ ou un facteur anti-anti- σ (figure 40). La (ou les) mutation(s) ainsi fixée(s) conduirai(en)t à l'expression de facteurs jouant un rôle différent. Ils empêcheraient la libération du facteur σ^{WhiG} . Dans le cas des deux mutants présentant une mutation dans *whiG*, si ce type de mutant est produit spécifiquement pendant la réponse stringente, nous pourrions envisager que le ppGpp augmente directement ou indirectement la transcription du gène *whiG* et augmente par conséquent la probabilité qu'une mutation se fixe dans le gène *whiG* (figure 40). Cette hypothèse peut être testée en analysant par RT-PCR quantitative le niveau de transcrits *whiG* dans des souches cultivées sur milieu carencé en bacto-tryptone. Ces hypothèses peuvent ainsi rendre compte des résultats obtenus car, dans ces cas, ce type de modification génétique conduirait de façon héritable au phénotype Pig-pap (figure 40).

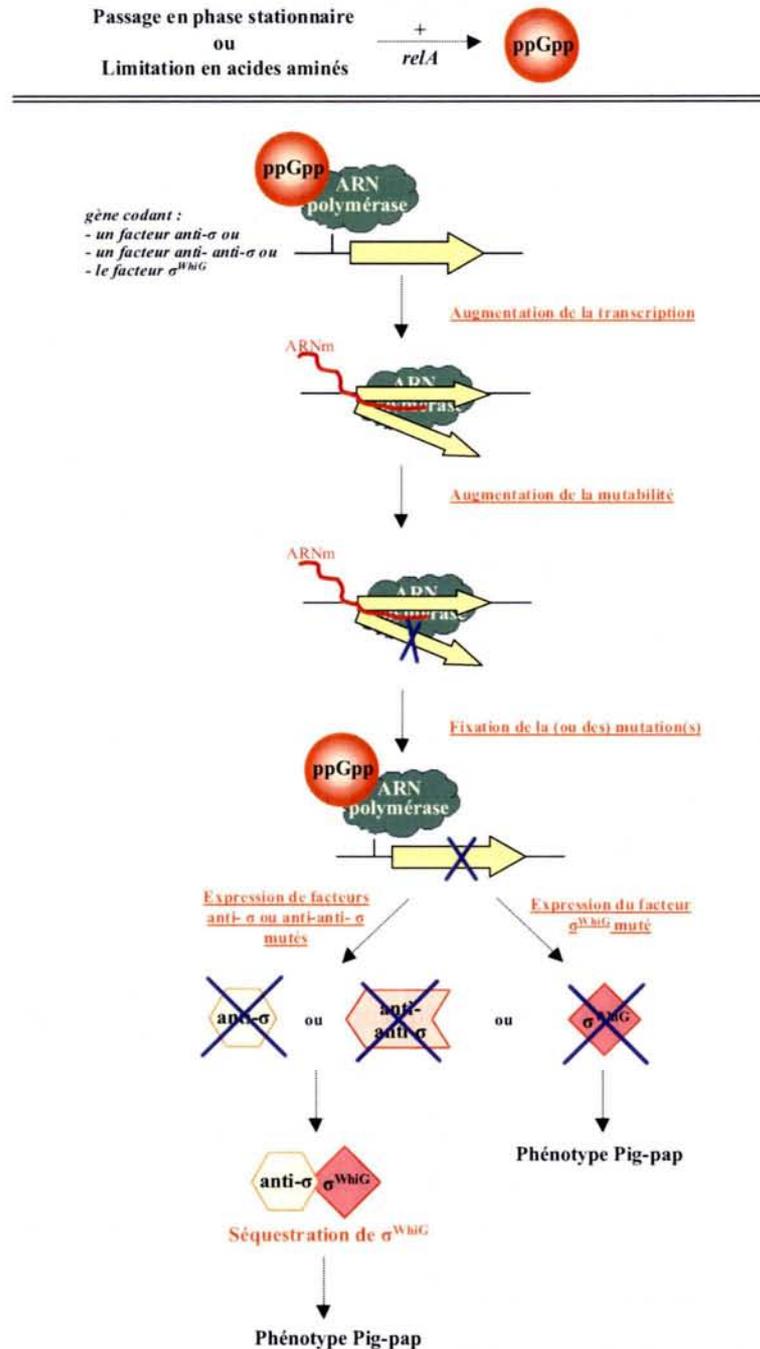


Figure 40 :

Représentation schématique du modèle putatif de l'implication du ppGpp, produit du gène *relA*, dans la formation de mutants Pig-pap. Le ppGpp pourrait augmenter la transcription et par conséquent la mutabilité d'un gène codant un facteur anti- σ et/ou d'un gène codant un facteur anti-anti- σ et/ou du gène *whiG*. Les mutations non réparées seraient fixées au niveau du brin d'ADN non transcrit. Les facteurs anti- σ ou anti-anti- σ ainsi mutés conduiraient à la séquestration en continu de σ^{WhiG} . L'absence de σ^{WhiG} sous forme libre aboutirait, dans ce cas, au phénotype Pig-pap. Une mutation dans le gène *whiG* conduirait directement au phénotype Pig-pap.

4. Perspectives générales et conclusion

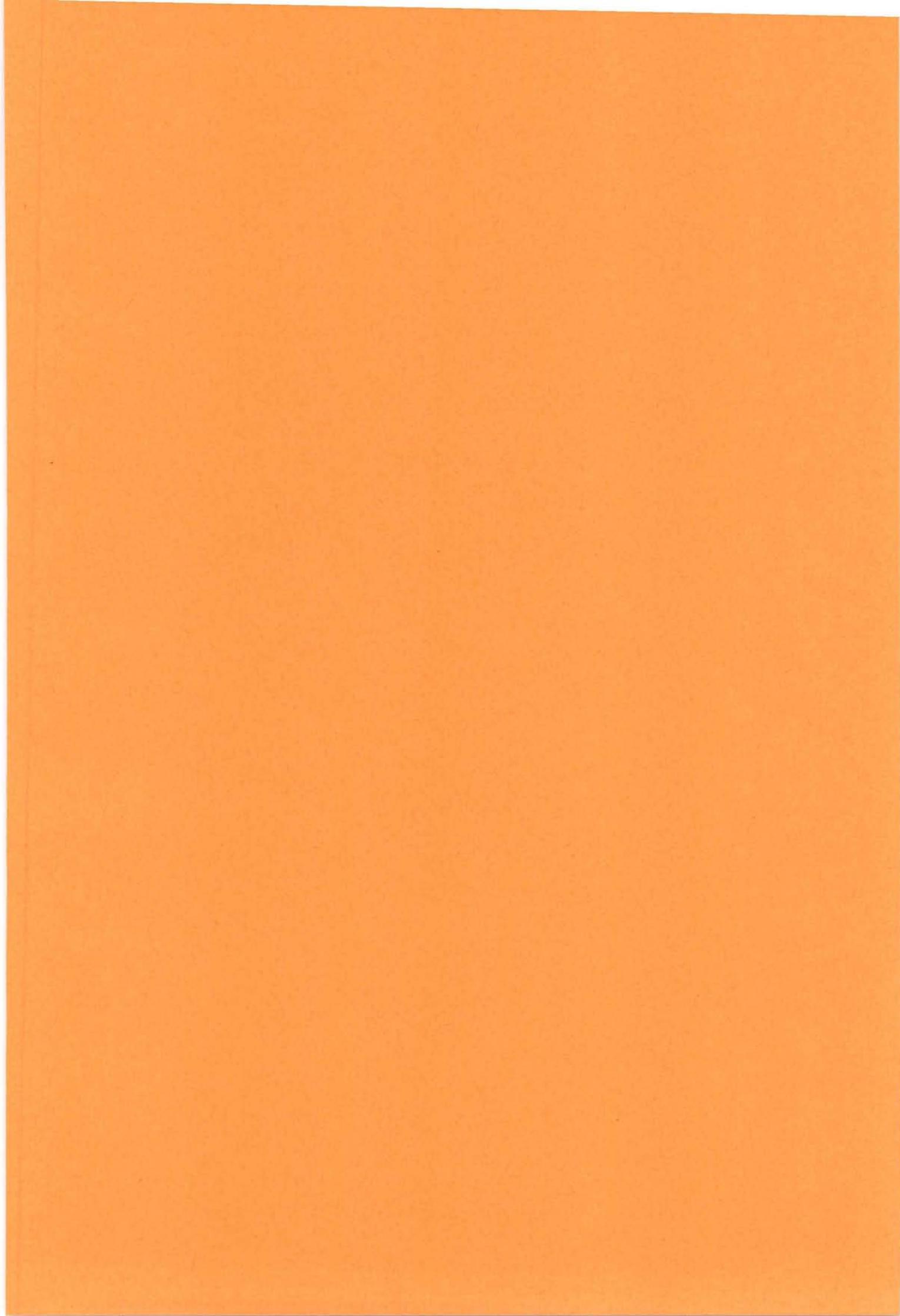
La thématique de cette thèse a porté sur l'implication de facteurs génétiques et environnementaux dans la dynamique mutationnelle qui se met en place au cours de la différenciation morphologique et physiologique de *S. ambofaciens*.

Les résultats obtenus ont permis, dans un premier temps, d'aborder le thème de la dynamique des structures chromosomiques chez *Streptomyces*. Cette dynamique conduit à la sélection d'événements de remaniements du chromosome qui affectent ses extrémités. La sélection de tels événements pourrait conférer un avantage adaptatif à la bactérie. En effet, la caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche 29C1 a permis de mettre en évidence une relation entre la présence de réarrangements génomiques de grande taille et la synthèse d'un nouveau métabolite secondaire. Ce résultat s'inscrit dans l'étude de l'impact des réarrangements génomiques sur la physiologie des souches mutantes. De plus, d'un point de vue appliqué, l'élucidation de la nature de ce produit synthétisé pourrait aboutir à la découverte de nouveaux produits d'intérêt biotechnologique.

Dans un deuxième temps, une autre facette de la dynamique mutationnelle a été étudiée. Elle correspond à la production à haute fréquence de mutants, appelés Pig-pap, générés au cours de la différenciation du mycélium aérien. Nous avons montré que ces mutants présentent un phénotype « *whiG*-like » et que la séquence de ce gène et son taux de transcription n'étaient pas différents de la souche sauvage. Ceci suggérerait que la régulation post-transcriptionnelle de *whiG* soit modifiée chez ce type de mutants. Une hypothèse envisagée est la séquestration du facteur σ^{WhiG} par un facteur anti- σ muté. La caractérisation de ce type de mutants pourrait donc être précieuse pour l'étude du mode de régulation de σ^{WhiG} chez *Streptomyces*. D'autre part, la production de tels mutants est modulable. En effet, un facteur environnemental, la carence en acides aminés, augmente la mutabilité. La réponse stringente déclenchée par ce type de stress conduit à la production importante de mutants Pig-pap au sein de la colonie. Il existerait donc une relation entre le ppGpp produit lors de la réponse stringente et le facteur σ^{WhiG} non fonctionnel chez les mutants Pig-pap. L'élucidation de ce lien permettrait d'identifier le mécanisme moléculaire responsable de la mise en place de l'état mutateur.

IV. REFERENCES

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



- Abraham, J. M., Freitag, C. S., Gander, R. M., Clements, J. R., Thomas, V. L. & Eisenstein, B. I. (1986).** Fimbrial phase variation and DNA rearrangements in uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Med* **3**, 495-508.
- Abraham, S. N. & Beachey, E. H. (1987).** Assembly of a chemically synthesized peptide of *Escherichia coli* type 1 fimbriae into fimbria-like antigenic structures. *J Bacteriol* **169**, 2460-2465.
- Aigle, B., Schneider, D., Morilhat, C., Vandewiele, D., Dary, A., Holl, A. C., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1996).** An amplifiable and deletable locus of *Streptomyces ambofaciens* RP181110 contains a very large gene homologous to polyketide synthase genes. *Microbiology* **142** (Pt 10), 2815-2824.
- Ainsa, J. A., Parry, H. D. & Chater, K. F. (1999).** A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **34**, 607-619.
- Allgood, N. D. & Silhavy, T. J. (1991).** *Escherichia coli* xonA (sbcB) mutants enhance illegitimate recombination. *Genetics* **127**, 671-680.
- Alm, R. A. & Trust, T. J. (1999).** Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med* **77**, 834-846.
- Alm, R. A., Ling, L. S., 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. & Trust, T. J. (1999).** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.
- Andersson, D. I., Slechta, E. S. & Roth, J. R. (1998).** Evidence that gene amplification underlies adaptive mutability of the bacterial lac operon. *Science* **282**, 1133-1135.
- Arber, W. (1993).** Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* **135**, 49-56.
- Arnosti, D. N. & Chamberlin, M. J. (1989).** Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 830-834.
- Au, K. G., Clark, S., Miller, J. H. & Modrich, P. (1989).** *Escherichia coli* mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8877-8881.

- Aubert, M., Weber, E., Schneider, D., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1993).** Primary structure analysis of a duplicated region in the amplifiable AUD6 locus of *Streptomyces ambofaciens* DSM40697. *FEMS Microbiol Lett* **113**, 49-56.
- Autret, S., Levine, A., Vannier, F., Fujita, Y. & Seror, S. J. (1999).** The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol Microbiol* **31**, 1665-1679.
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001).** Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J Mol Biol* **305**, 673-688.
- Bartlett, D. H. & Silverman, M. (1989).** Nucleotide sequence of IS492, a novel insertion sequence causing variation in extracellular polysaccharide production in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica*. *J Bacteriol* **171**, 1763-1766.
- Becker, G., Klauck, E. & Hengge-Aronis, R. (2000).** The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti-sigmaS factor. *Mol Microbiol* **35**, 657-666.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Berk, R. S. (1963).** Nutritional Studies on the "Auto-Plaque" Phenomenon in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Bacteriol* **86**, 728-734.
- Bibb, M. (1996).** 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142 (Pt 6)**, 1335-1344.
- Bibb, M. J. & Buttner, M. J. (2003).** The *Streptomyces coelicolor* developmental transcription factor sigmaBldN is synthesized as a proprotein. *J Bacteriol* **185**, 2338-2345.

- Bierne, H., Seigneur, M., Ehrlich, S. D. & Michel, B. (1997).** uvrD mutations enhance tandem repeat deletion in the Escherichia coli chromosome via SOS induction of the RecF recombination pathway. *Mol Microbiol* **26**, 557-567.
- Bignell, D. R., Lau, L. H., Colvin, K. R. & Leskiw, B. K. (2003).** The putative anti-anti-sigma factor BldG is post-translationally modified by phosphorylation in Streptomyces coelicolor. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 93-99.
- Birch, A., Hausler, A., Ruttener, C. & Hutter, R. (1991).** Chromosomal deletion and rearrangement in Streptomyces glaucescens. *J Bacteriol* **173**, 3531-3538.
- Bishop, R. E., Leskiw, B. K., Hodges, R. S., Kay, C. M. & Weiner, J. H. (1998).** The entericidin locus of Escherichia coli and its implications for programmed bacterial cell death. *J Mol Biol* **280**, 583-596.
- Bjorkholm, B. M., Oh, J. D., Falk, P. G., Engstrand, L. G. & Gordon, J. I. (2001).** Genomics and proteomics converge on Helicobacter pylori. *Curr Opin Microbiol* **4**, 237-245.
- Blomfield, I. C., Kulasekara, D. H. & Eisenstein, B. I. (1997).** 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* **23**, 705-717.
- Borges, F. (2001).** Variabilité intraspécifique des extrémités du chromosome linéaire de Streptomyces ambofaciens: transfert horizontal et spécificité des séquences terminales. Stage de DEA, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy1, Nancy.
- Bourgoin, F., Pluvinet, A., Gintz, B., Decaris, B. & Guedon, G. (1999).** Are horizontal transfers involved in the evolution of the Streptococcus thermophilus exopolysaccharide synthesis loci? *Gene* **233**, 151-161.
- Boylan, S. A., Rutherford, A., Thomas, S. M. & Price, C. W. (1992).** Activation of Bacillus subtilis transcription factor sigma B by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals. *J Bacteriol* **174**, 3695-3706.
- Braaten, B. A., Nou, X., Kaltenbach, L. S. & Low, D. A. (1994).** Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in E. coli. *Cell* **76**, 577-588.

- Bridges, B. A. & Timms, A. R. (1997).** Mutation in *Escherichia coli* under starvation conditions: a new pathway leading to small deletions in strains defective in mismatch correction. *Embo J* **16**, 3349-3356.
- Brown, K. L. & Hughes, K. T. (1995).** The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* **16**, 397-404.
- Budrene, E. O. & Berg, H. C. (1991).** Complex patterns formed by motile cells of *Escherichia coli*. *Nature* **349**, 630-633.
- Burrus, V., Bontemps, C., Decaris, B. & Guedon, G. (2001).** Characterization of a novel type II restriction-modification system, Sth368I, encoded by the integrative element ICEStI of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1522-1528.
- Caillet-Fauquet, P., Maenhaut-Michel, G. & Radman, M. (1984).** SOS mutator effect in *E. coli* mutants deficient in mismatch correction. *Embo J* **3**, 707-712.
- Cairns, J. & Foster, P. L. (1991).** Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**, 695-701.
- Cairns, J., Overbaugh, J. & Miller, S. (1988).** The origin of mutants. *Nature* **335**, 142-145.
- Cellini, L., Robuffo, I., Maraldi, N. M. & Donelli, G. (2001).** Searching the point of no return in *Helicobacter pylori* life: necrosis and/or programmed death? *J Appl Microbiol* **90**, 727-732.
- Chakraborty, R. & Bibb, M. (1997).** The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J Bacteriol* **179**, 5854-5861.
- Chalmers, R. & Blot, M. (1999).** Insertion sequences and transposons., in: R.L. Charlebois (Ed.), *Organization of the prokaryotic genome.*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 151-169.
- Chater, K., Bibb, M., Bruton, C., Hopwood, D., Janssen, G., Malpartida, F. & Smith, C. (1984).** Dissecting the *Streptomyces* genome. *Biochem Soc Trans* **12**, 584-586.
- Chater, K. F. (1972).** A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **72**, 9-28.

- Chater, K. F. (1993).** Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* **47**, 685-713.
- Chater, K. F. (1998).** Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**, 1465-1478.
- Chater, K. F. (2001).** Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* **4**, 667-673.
- Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Mendez, C. & Helmann, J. D. (1989).** The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. *Cell* **59**, 133-143.
- Chatterji, D., Fujita, N. & Ishihama, A. (1998).** The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells* **3**, 279-287.
- Checroun, C., Bordes, P., Leroy, O., Kolb, A. & Gutierrez, C. (2004).** Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of sigmaS, the stress-specific sigma factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements. *Nucleic Acids Res* **32**, 45-53.
- Cho, Y.H., Lee, E.J., Ahn, B.E., Roe, J.H. (2001)** SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **42**, 205-214.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Cox, E. C. (1976).** Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu Rev Genet* **10**, 135-156.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. & Kolter, R. (2000).** The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**, 424-432.
- Darst, S. A. (2001).** Bacterial RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 155-162.
- Dary, A., Bourget, N., Girard, N., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1992).** Amplification of a particular DNA sequence in *Streptomyces ambofaciens* RP181110 reversibly prevents spiramycin production. *Res Microbiol* **143**, 99-112.

- Daveran-Mingot, M. L., Campo, N., Ritzenthaler, P. & Le Bourgeois, P. (1998).** A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences. *J Bacteriol* **180**, 4834-4842.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- Davis, N. K. & Chater, K. F. (1990).** Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol Microbiol* **4**, 1679-1691.
- Davis, N. K. & Chater, K. F. (1992).** The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol Gen Genet* **232**, 351-358.
- Davison, J. (1999).** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**, 73-91.
- de Crecy-Lagard, V., Servant-Moisson, P., Viala, J., Grandvalet, C. & Mazodier, P. (1999).** Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **32**, 505-517.
- De Las Penas, A., Connolly, L. & Gross, C. A. (1997).** The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24**, 373-385.
- DeMaio, J., Zhang, Y., Ko, C. & Bishai, W. R. (1997).** Mycobacterium tuberculosis sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons. *Tuber Lung Dis* **78**, 3-12.
- Demuyter, P., Leblond, P., Decaris, B. & Simonet, J. M. (1988).** Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*. *J Gen Microbiol* **134** (Pt 7), 2001-2007.
- Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenailon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M. & Matic, I. (2000).** Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* **103**, 711-721.

- Diederich, B., Wilkinson, J. F., Magnin, T., Najafi, M., Errington, J. & Yudkin, M. D. (1994).** Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **8**, 2653-2663.
- Dohet, C., Wagner, R. & Radman, M. (1986).** Methyl-directed repair of frameshift mutations in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3395-3397.
- Dombroski, A. J., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1993).** The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. *Cell Mol Biol Res* **39**, 311-317.
- Dorman, C. J. & Higgins, C. F. (1987).** Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J Bacteriol* **169**, 3840-3843.
- Duncan, B. K. & Weiss, B. (1982).** Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **151**, 750-755.
- Dybvig, K. (1993).** DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol* **10**, 465-471.
- Dzidic, S. & Petranovic, M. (2003).** Mismatch repair in the antimutator *Escherichia coli* mud. *Mutat Res* **522**, 27-32.
- Eguchi, Y., Itoh, T. & Tomizawa, J. (1991).** Antisense RNA. *Annu Rev Biochem* **60**, 631-652.
- Elliot, M. A. & Leskiw, B. K. (1999).** The BldD protein from *Streptomyces coelicolor* is a DNA-binding protein. *J Bacteriol* **181**, 6832-6835.
- Engelberg-Kulka, H. & Glaser, G. (1999).** Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**, 43-70.
- Farr, S. B., D'Ari, R. & Touati, D. (1986).** Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8268-8272.
- Feinstein, S. I. & Low, K. B. (1986).** Hyper-recombining recipient strains in bacterial conjugation. *Genetics* **113**, 13-33.
- Fernandez-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A. & Malpartida, F. (1991).** The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**, 769-780.

- Fiil, N. P., von Meyenburg, K. & Friesen, J. D. (1972).** Accumulation and turnover of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **71**, 769-783.
- Fijalkowska, I. J. & Schaaper, R. M. (1995).** Effects of *Escherichia coli* dnaE antimutator alleles in a proofreading-deficient mutD5 strain. *J Bacteriol* **177**, 5979-5986.
- Fischer, G., Decaris, B. & Leblond, P. (1997).** Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J Bacteriol* **179**, 4553-4558.
- Fischer, G., Kyriacou, A., Decaris, B. & Leblond, P. (1997).** Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*. *Biochimie* **79**, 555-558.
- Fischer, G., Wenner, T., Decaris, B. & Leblond, P. (1998).** Chromosomal arm replacement generates a high level of intraspecific polymorphism in the terminal inverted repeats of the linear chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14296-14301.
- Flardh, K., Findlay, K. C. & Chater, K. F. (1999).** Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145 (Pt 9)**, 2229-2243.
- Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M. L., Davila, G., Romero, D. & Palacios, R. (1993).** Gene amplification in *Rhizobium*: identification and in vivo cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4932-4936.
- Foster, P. L. (2000).** Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 21-29.
- Foster, P. L. & Rosche, W. A. (1999).** Mechanisms of mutation in nondividing cells. Insights from the study of adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* **870**, 133-145.
- Fowler, R. G., White, S. J., Koyama, C., Moore, S. C., Dunn, R. L. & Schaaper, R. M. (2003).** Interactions among the *Escherichia coli* mutT, mutM, and mutY damage prevention pathways. *DNA Repair (Amst)* **2**, 159-173.

- Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M. & et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* **1**, 183-189.
- Gaidenko, T. A. & Price, C. W. (1998). General stress transcription factor sigmaB and sporulation transcription factor sigmaH each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. *J Bacteriol* **180**, 3730-3733.
- Gallant, J., Margason, G. & Finch, B. (1972). On the turnover of ppGpp in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **247**, 6055-6058.
- Gally, D. L., Bogan, J. A., Eisenstein, B. I. & Blomfield, I. C. (1993). Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* **175**, 6186-6193.
- Genay, M. (2003). Modulation de la production de mutants non sporulants de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 en fonction de la quantité de nutriments présents dans le milieu. Stage de DEA, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy1, Nancy.
- Gerdes, K., Nielsen, A., Thorsted, P. & Wagner, E. G. (1992). Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable hok, srnB and pndA effector messenger RNAs. *J Mol Biol* **226**, 637-649.
- Gerdes, K., Gulyaev, A. P., Franch, T., Pedersen, K. & Mikkelsen, N. D. (1997). Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet* **31**, 1-31.
- Gibbs, C. P. & Meyer, T. F. (1996). Genome plasticity in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett* **145**, 173-179.
- Giraud, A., Radman, M., Matic, I. & Taddei, F. (2001). The rise and fall of mutator bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 582-585.
- Glickman, B. W. (1979). Spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA: an altered mutational spectrum in dam- mutants. *Mutat Res* **61**, 153-162.

- Gotfredsen, M. & Gerdes, K. (1998).** The Escherichia coli relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* **29**, 1065-1076.
- Gottesman, S. (1996).** Proteases and their targets in Escherichia coli. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.
- Gottesman, S. (1999).** Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Microbiol* **2**, 142-147.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1997).** How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343-349.
- Gross, M. D. & Siegel, E. C. (1981).** Incidence of mutator strains in Escherichia coli and coliforms in nature. *Mutat Res* **91**, 107-110.
- Haas, R. & Meyer, T. F. (1987).** Molecular principles of antigenic variation in Neisseria gonorrhoeae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**, 431-434.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997).** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**, 1089-1097.
- Hammer, B. K. & Swanson, M. S. (1999).** Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33**, 721-731.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W. D., Gerardy-Schahn, R. & Frosch, M. (1996).** Capsule phase variation in Neisseria meningitidis serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**, 1211-1220.
- Harris, B. Z., Kaiser, D. & Singer, M. (1998).** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in myxococcus xanthus. *Genes Dev* **12**, 1022-1035.
- Harris, R. S., Longrich, S. & Rosenberg, S. M. (1994).** Recombination in adaptive mutation. *Science* **264**, 258-260.
- Harris, R. S., Ross, K. J. & Rosenberg, S. M. (1996).** Opposing roles of the holliday junction processing systems of Escherichia coli in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics* **142**, 681-691.

- Harris, R. S., Feng, G., Ross, K. J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S. K., Winkler, M. E. & Rosenberg, S. M. (1997).** Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. *Genes Dev* **11**, 2426-2437.
- Harris, R. S., Feng, G., Ross, K. J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S. K., Hastings, P. J., Winkler, M. E. & Rosenberg, S. M. (1999).** Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. *Mutat Res* **437**, 51-60.
- Haseltine, W. A. & Block, R. (1973).** Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1564-1568.
- Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417-428.
- Helmann, J. D. & Chamberlin, M. J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**, 839-872.
- Henderson, I. R., Owen, P. & Nataro, J. P. (1999).** Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**, 919-932.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 341-346.
- Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R. & Bouloc, P. (1995).** Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3516-3520.
- Herman, R. K. & Dworkin, N. B. (1971).** Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **106**, 543-550.
- Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K. A., Laker, M., Pardington, P. E., Richardson, A. P., Tonks, M., Beecher, D. J., Kemp, J. D., Kolsto, A. B., Wong, A. C., Keim, P. & Jackson, P. J. (2004).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1068-1080.
- Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K., Keener, J. & Kustu, S. (1985).** Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7525-7529.

- Hochman, A. (1997).** Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* **23**, 207-214.
- Holliday, R. (1994).** Epigenetics: an overview. *Dev Genet* **15**, 453-457.
- Horst, J. P., Wu, T. H. & Marinus, M. G. (1999).** Escherichia coli mutator genes. *Trends Microbiol* **7**, 29-36.
- Hoyt, S. & Jones, G. H. (1999).** relA is required for actinomycin production in Streptomyces antibioticus. *J Bacteriol* **181**, 3824-3829.
- Hsieh, P. (2001).** Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res* **486**, 71-87.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001).** The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517-2528.
- Ikeda, J. S., Schmitt, C. K., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S., Adams, P., O'Connor, C. D. & O'Brien, A. D. (2001).** Flagellar phase variation of Salmonella enterica serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence Salmonella-induced enteropathogenesis. *Infect Immun* **69**, 3021-3030.
- Ishihama, A. (2000).** Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**, 499-518.
- Janssen, G. R. & Dworkin, M. (1985).** Cell-cell interactions in developmental lysis of Myxococcus xanthus. *Dev Biol* **112**, 194-202.
- Jiang, D., Hatahet, Z., Melamede, R. J., Kow, Y. W. & Wallace, S. S. (1997).** Characterization of Escherichia coli endonuclease VIII. *J Biol Chem* **272**, 32230-32239.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. & Taylor, D. E. (1996).** Variability of gene order in different Helicobacter pylori strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol* **20**, 833-842.
- Jishage, M. & Ishihama, A. (1998).** A stationary phase protein in Escherichia coli with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4953-4958.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V. & Nystrom, T. (2002).** Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**, 1260-1270.

- Jones, M., Wagner, R. & Radman, M. (1987).** Mismatch repair and recombination in *E. coli*. *Cell* **50**, 621-626.
- Jyssum, K. (1960).** Observations on two types of genetic instability in *Escherichia coli*. *Acta Pathol Microbiol Scand* **48**, 113-120.
- Kameoka, D., Lezhava, A., Zenitani, H., Hiratsu, K., Kawamoto, M., Goshi, K., Inada, K., Shinkawa, H. & Kinashi, H. (1999).** Analysis of fusion junctions of circularized chromosomes in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **181**, 5711-5717.
- Kang, S. G., Jin, W., Bibb, M. & Lee, K. J. (1998).** Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 221-226.
- Kelemen, G. H., Brown, G. L., Kormanec, J., Potuckova, L., Chater, K. F. & Buttner, M. J. (1996).** 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* **21**, 593-603.
- Kelemen, G. H., Viollier, P. H., Tenor, J., Marri, L., Buttner, M. J. & Thompson, C. J. (2001).** A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **40**, 804-814.
- Kellis, M., Birren, B. W. & Lander, E. S. (2004).** Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624.
- Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1995).** DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* **64**, 171-200.
- Keseler, I. M. & Kaiser, D. (1997).** *sigma54*, a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1979-1984.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation.
- Kitten, T., Barrera, A. V. & Barbour, A. G. (1993).** Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol* **175**, 2516-2522.

- Kolb, A., Kotlarz, D., Kusano, S. & Ishihama, A. (1995).** Selectivity of the Escherichia coli RNA polymerase E sigma 38 for overlapping promoters and ability to support CRP activation. *Nucleic Acids Res* **23**, 819-826.
- Kormanec, J., Potuckova, L. & Rezuchova, B. (1994).** The Streptomyces aureofaciens homologue of the whiG gene encoding a putative sigma factor essential for sporulation. *Gene* **143**, 101-103.
- Kormanec, J., Novakova, R., Homerova, D. & Sevcikova, B. (1999).** The Streptomyces aureofaciens homologue of the sporulation gene whiH is dependent on rpoZ-encoded sigma factor. *Biochim Biophys Acta* **1444**, 80-84.
- Kormanec, J., Novakova, R., Homerova, D. & Rezuchova, B. (2001).** Streptomyces aureofaciens sporulation-specific sigma factor sigma(rpoZ) directs expression of a gene encoding protein similar to hydrolases involved in degradation of the lignin-related biphenyl compounds. *Res Microbiol* **152**, 883-888.
- Kotani, H., Germann, M. W., Andrus, A., Vinayak, R., Mullah, B. & Kmiec, E. B. (1996).** RNA facilitates RecA-mediated DNA pairing and strand transfer between molecules bearing limited regions of homology. *Mol Gen Genet* **250**, 626-634.
- Kroos, L., Zhang, B., Ichikawa, H. & Yu, Y. T. (1999).** Control of sigma factor activity during Bacillus subtilis sporulation. *Mol Microbiol* **31**, 1285-1294.
- Kuhar, I. & Zgur-Bertok, D. (1999).** Transcription regulation of the colicin K cka gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J Bacteriol* **181**, 7373-7380.
- Kulasekara, H. D. & Blomfield, I. C. (1999).** The molecular basis for the specificity of fimE in the phase variation of type 1 fimbriae of Escherichia coli K-12. *Mol Microbiol* **31**, 1171-1181.
- Kullik, I., Fritsche, S., Knobel, H., Sanjuan, J., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (1991).** Bradyrhizobium japonicum has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (rpoN). *J Bacteriol* **173**, 1125-1138.
- Kumagai, I., Takeda, S. & Miura, K. (1992).** Functional conversion of the homologous proteins alpha-lactalbumin and lysozyme by exon exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5887-5891.

- Kunkel, B., Losick, R. & Stragier, P. (1990).** The *Bacillus subtilis* gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Genes Dev* **4**, 525-535.
- Kunz, B. A., Henson, E. S., Roche, H., Ramotar, D., Nunoshiba, T. & Demple, B. (1994).** Specificity of the mutator caused by deletion of the yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8165-8169.
- Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A. & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997).** Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* **65**, 3672-3679.
- Kutsukake, K. & Iino, T. (1994).** Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**, 3598-3605.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994).** The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* **8**, 1600-1612.
- Lauder, S. D. & Kowalczykowski, S. C. (1993).** Negative co-dominant inhibition of *recA* protein function. Biochemical properties of the *recA1*, *recA13* and *recA56* proteins and the effect of *recA56* protein on the activities of the wild-type *recA* protein function in vitro. *J Mol Biol* **234**, 72-86.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1997).** Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* **44**, 383-397.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1998).** Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9413-9417.
- Lawrence, J. G. & Roth, J.R. (1999).** Genomic flux: genome evolution by gene loss and acquisition., in: R.L. Charlebois (Ed.), *Organization of the prokaryotic genome.*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 263-288.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. & Caldwell, D. E. (1991).** Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* **173**, 6558-6567.
- Leblond, P. & Decaris, B. (1994).** New insights into the genetic instability of streptomyces. *FEMS Microbiol Lett* **123**, 225-232.

- Leblond, P. & Decaris, B. (1999).** Unstable linear chromosomes: the case of *Streptomyces*, in: R.L. Charlebois (Ed.), *Organization of the prokaryotic genome.*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 235-261.
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1990).** Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Mol Microbiol* **4**, 707-714.
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1991).** 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* **173**, 4229-4233.
- Leblond, P., Fischer, G., Francou, F. X., Berger, F., Guerineau, M. & Decaris, B. (1996).** The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol Microbiol* **19**, 261-271.
- LeClerc, J. E., Li, B., Payne, W. L. & Cebula, T. A. (1996).** High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**, 1208-1211.
- LeClerc, J. E., Payne, W. L., Kupchella, E. & Cebula, T. A. (1998).** Detection of mutator subpopulations in *Salmonella typhimurium* LT2 by reversion of his alleles. *Mutat Res* **400**, 89-97.
- Lejeune, P. & Danchin, A. (1990).** Mutations in the *bglY* gene increase the frequency of spontaneous deletions in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 360-363.
- Leong, P. M., Hsia, H. C. & Miller, J. H. (1986).** Analysis of spontaneous base substitutions generated in mismatch-repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **168**, 412-416.
- Lewis, K. (2000).** Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 503-514.
- Li, M., Moyle, H. & Susskind, M. M. (1994).** Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science* **263**, 75-77.
- Lin, M., Payne, D. A. & Schwarz, J. R. (2003).** Intraspecific diversity of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay water and oysters as determined by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3170-3175.
- Lin, R. J., Capage, M. & Hill, C. W. (1984).** A repetitive DNA sequence, *rhs*, responsible for duplications within the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Mol Biol* **177**, 1-18.

- Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. & Chen, C. W. (1993).** The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* **10**, 923-933.
- Liu, S. L. & Sanderson, K. E. (1995).** The chromosome of *Salmonella paratyphi* A is inverted by recombination between *rrnH* and *rrnG*. *J Bacteriol* **177**, 6585-6592.
- Liu, S. L. & Sanderson, K. E. (1996).** Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10303-10308.
- Loewen, P.C., Hu, B., Strutinsky, J., Sparling, R. (1998).** Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**, 707-717.
- Losick, R. & Stragier, P. (1992).** Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355**, 601-604.
- Lynch, M. J., Swift, S., Kirke, D. F., Keevil, C. W., Dodd, C. E. & Williams, P. (2002).** The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* **4**, 18-28.
- Lynn, W. H., 3rd, Genco, C. A. & Forng, R. Y. (1995).** Analysis of the insertion characteristics of Tn4351 during high frequency transposition of *Porphyromonas gingivalis*. *Nda J* **46**, 15-17.
- Macintyre, G., Doiron, K. M. & Cupples, C. G. (1997).** The Vsr endonuclease of *Escherichia coli*: an efficient DNA repair enzyme and a potent mutagen. *J Bacteriol* **179**, 6048-6052.
- Mackay, W. J., Han, S. & Samson, L. D. (1994).** DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 3224-3230.
- Magnin, T., Lord, M., Errington, J. & Yudkin, M. D. (1996).** Establishing differential gene expression in sporulating *Bacillus subtilis*: phosphorylation of SpoIIAA (anti-anti-sigmaF) alters its conformation and prevents formation of a SpoIIAA/SpoIIAB/ADP complex. *Mol Microbiol* **19**, 901-907.
- Majewski, J., Zawadzki, P., Pickerill, P., Cohan, F. M. & Dowson, C. G. (2000).** Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol* **182**, 1016-1023.
- Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992).** MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**, 273-275.

- Maki, H., Mo, J. Y. & Sekiguchi, M. (1991).** A strong mutator effect caused by an amino acid change in the alpha subunit of DNA polymerase III of Escherichia coli. *J Biol Chem* **266**, 5055-5061.
- Mao, E. F., Lane, L., Lee, J. & Miller, J. H. (1997).** Proliferation of mutators in A cell population. *J Bacteriol* **179**, 417-422.
- Marshall, D. G., Dundon, W. G., Beesley, S. M. & Smyth, C. J. (1998).** Helicobacter pylori--a conundrum of genetic diversity. *Microbiology* **144 (Pt 11)**, 2925-2939.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H. & Deretic, V. (1993).** Differentiation of Pseudomonas aeruginosa into the alginate-producing form: inactivation of mucB causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* **9**, 497-506.
- Martin, P., Dary, A. & Decaris, B. (1998).** Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium Streptomyces ambofaciens: characterization of different mutator states. *Mutat Res* **421**, 73-82.
- Martin, P., Dary, A., Andre, A., Fischer, G., Leblond, P. & Decaris, B. (1999).** Intracolonial polymorphism in the bacterium Streptomyces ambofaciens ATCC23877: evidence for a high degree of heterogeneity of the wild type clones. *Mutat Res* **430**, 75-85.
- Martin, P. (2000).** La génération d'un polymorphisme génétique intracolonial est modulée pendant la différenciation chez Streptomyces ambofaciens ATCC23877. Thèse, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy1, Nancy.
- Matic, I., Radman, M. & Rayssiguier, C. (1994).** Structure of recombinants from conjugational crosses between Escherichia coli donor and mismatch-repair deficient Salmonella typhimurium recipients. *Genetics* **136**, 17-26.
- Matsushima, P. & Baltz, R. H. (1996).** A gene cloning system for 'Streptomyces toyocaensis'. *Microbiology* **142 (Pt 2)**, 261-267.
- McBride, S. & Haldenwang, W. G. (2004).** Sporulation phenotype of a Bacillus subtilis mutant expressing an unprocessable but active sigmaE transcription factor. *J Bacteriol* **186**, 1999-2005.
- McGlynn, P. & Lloyd, R. G. (2000).** Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* **101**, 35-45.

- McHenry, C. S. (1985).** DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: components and function of a true replicative complex. *Mol Cell Biochem* **66**, 71-85.
- Mechanic, L. E., Frankel, B. A. & Matson, S. W. (2000).** *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol Chem* **275**, 38337-38346.
- Mechold, U., Cashel, M., Steiner, K., Gentry, D. & Malke, H. (1996).** Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* **178**, 1401-1411.
- Mehr, I. J. & Seifert, H. S. (1998).** Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. *Mol Microbiol* **30**, 697-710.
- Merickel, S. K., Haykinson, M. J. & Johnson, R. C. (1998).** Communication between *Hin* recombinase and *Fis* regulatory subunits during coordinate activation of *Hin*-catalyzed site-specific DNA inversion. *Genes Dev* **12**, 2803-2816.
- Merrick, M. J. (1993).** In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* **10**, 903-909.
- Metzger, S., Schreiber, G., Aizenman, E., Cashel, M. & Glaser, G. (1989).** Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA1* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**, 21146-21152.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M. & Horvitz, H. R. (1998).** Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* **14**, 410-416.
- Michaels, M. L., Cruz, C. & Miller, J. H. (1990).** *mutA* and *mutC*: two mutator loci in *Escherichia coli* that stimulate transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9211-9215.
- Michaels, M. L., Pham, L., Cruz, C. & Miller, J. H. (1991).** *MutM*, a protein that prevents G.C----T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* **19**, 3629-3632.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P. & Miller, J. H. (1992).** Evidence that *MutY* and *MutM* combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7022-7025.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. & Hacker, J. (2004).** Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**, 3086-3096.

- Migueluez, E. M., Hardisson, C. & Manzanal, M. B. (1999).** Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol* **145**, 515-525.
- Miller, J. H. (1998).** Mutators in *Escherichia coli*. *Mutat Res* **409**, 99-106.
- Min, K. T., Hilditch, C. M., Diederich, B., Errington, J. & Yudkin, M. D. (1993).** Sigma F, the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti-sigma factor that is also a protein kinase. *Cell* **74**, 735-742.
- Mittenhuber, G. (1999).** Occurrence of mazEF-like antitoxin/toxin systems in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 295-302.
- Modrich, P. (1989).** Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem* **264**, 6597-6600.
- Modrich, P. (1991).** Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25**, 229-253.
- Molle, V. & Buttner, M. J. (2000).** Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Mol Microbiol* **36**, 1265-1278.
- Molle, V., Palframan, W. J., Findlay, K. C. & Buttner, M. J. (2000).** *WhiD* and *WhiB*, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**, 1286-1295.
- Moore, J. K. & Haber, J. E. (1996).** Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 2164-2173.
- Morona, J. K., Morona, R. & Paton, J. C. (1999).** Comparative genetics of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* types belonging to serogroup 19. *J Bacteriol* **181**, 5355-5364.
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A. & Lenski, R. E. (1994).** Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* **4**, 24-33.
- Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, R. N. & Schellhorn, H. E. (2000).** Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol* **37**, 371-381.

- Murphy, G. L., Connell, T. D., Barritt, D. S., Koomey, M. & Cannon, J. G. (1989).** Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell* **56**, 539-547.
- Nghiem, Y., Cabrera, M., Cupples, C. G. & Miller, J. H. (1988).** The mutY gene: a mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2709-2713.
- Ninio, J. (1991).** Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates. *Genetics* **129**, 957-962.
- Nodwell, J. R., Yang, M., Kuo, D. & Losick, R. (1999).** Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**, 569-584.
- Novakova, R., Sevcikova, B. & Kormanec, J. (1998).** A method for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing a particular sigma factor: cloning of a developmentally regulated promoter and corresponding gene directed by the *Streptomyces aureofaciens* sigma factor RpoZ. *Gene* **208**, 43-50.
- Nugroho, F. A., Yamamoto, H., Kobayashi, Y. & Sekiguchi, J. (1999).** Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *J Bacteriol* **181**, 6230-6237.
- Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. (2000).** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304.
- Ogawara, H., Kasama, H., Nashimoto, K., Ohtsubo, M., Higashi, K. & Urabe, H. (1993).** Cloning, sequence and expression of the argG gene from *Streptomyces lavendulae*. *Gene* **125**, 91-96.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. & Iino, T. (1990).** Gene fliA encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* **221**, 139-147.
- Ohnishi, Y., Seo, J. W. & Horinouchi, S. (2002).** Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **216**, 1-7.
- Ohta, T., Ueguchi, C. & Mizuno, T. (1999).** rpoS function is essential for bgl silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 6278-6283.

- Olasz, F., Kiss, J., König, P., Buzas, Z., Stalder, R. & Arber, W. (1998). Target specificity of insertion element IS30. *Mol Microbiol* **28**, 691-704.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**, 1251-1254.
- Oller, A. R. & Schaaper, R. M. (1994). Spontaneous mutation in *Escherichia coli* containing the dnaE911 DNA polymerase antimutator allele. *Genetics* **138**, 263-270.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12215-12220.
- Onda, M., Hanada, K., Kawachi, H. & Ikeda, H. (1999). *Escherichia coli* mutM suppresses illegitimate recombination induced by oxidative stress. *Genetics* **151**, 439-446.
- Ouchane, S., Picaud, M., Vernotte, C. & Astier, C. (1997). Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *Embo J* **16**, 4777-4787.
- Paget, M. S., Kang, J. G., Roe, J. H. & Buttner, M. J. (1998). sigmaR, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo J* **17**, 5776-5782.
- Pandza, K., Pfalzer, G., Cullum, J. & Hranueli, D. (1997). Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology* **143** (Pt 5), 1493-1501.
- Pandza, S., Biukovic, G., Paravic, A., Dadbin, A., Cullum, J. & Hranueli, D. (1998). Recombination between the linear plasmid pPZG101 and the linear chromosome of *Streptomyces rimosus* can lead to exchange of ends. *Mol Microbiol* **28**, 1165-1176.
- Pang, X., Aigle, B., Girardet, J. M., Mangenot, S., Pernodet, J. L., Decaris, B. & Leblond, P. (2004). Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 575-588.

- Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1995).** The sigma 54-dependent promoter Ps of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* requires HU for transcriptional activation in vivo by XylR. *J Bacteriol* **177**, 3758-3763.
- Petit, M. A., Dimpfl, J., Radman, M. & Echols, H. (1991).** Control of large chromosomal duplications in *Escherichia coli* by the mismatch repair system. *Genetics* **129**, 327-332.
- Potuckova, L., Kelemen, G. H., Findlay, K. C., Lonetto, M. A., Buttner, M. J. & Kormanec, J. (1995).** A new RNA polymerase sigma factor, sigma F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Mol Microbiol* **17**, 37-48.
- Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H. & Barry, C. E., 3rd (2000).** The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**, 4889-4898.
- Prudhomme, M., Mejean, V., Martin, B. & Claverys, J. P. (1991).** Mismatch repair genes of *Streptococcus pneumoniae*: HexA confers a mutator phenotype in *Escherichia coli* by negative complementation. *J Bacteriol* **173**, 7196-7203.
- Radman, M., Taddei, F. & Matic, I. (2000).** Evolution-driving genes. *Res Microbiol* **151**, 91-95.
- Radnedge, L., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P. J., Ticknor, L. O., Keim, P. & Andersen, G. L. (2003).** Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2755-2764.
- Rahman, M. S. & Humayun, M. Z. (1999).** SOS and UVM pathways have lesion-specific additive and competing effects on mutation fixation at replication-blocking DNA lesions. *J Bacteriol* **181**, 1515-1523.
- Rather, P. N., Coppolecchia, R., DeGrazia, H. & Moran, C. P., Jr. (1990).** Negative regulator of sigma G-controlled gene expression in stationary-phase *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**, 709-715.
- Rauland, U., Glocker, I., Redenbach, M. & Cullum, J. (1995).** DNA amplifications and deletions in *Streptomyces lividans* 66 and the loss of one end of the linear chromosome. *Mol Gen Genet* **246**, 37-44.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S., Radman, M. (1989).** The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**, 396-401.

- Rayssiguier, C., Dohet, C. & Radman, M. (1991).** Interspecific recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* occurs by the RecABCD pathway. *Biochimie* **73**, 371-374.
- Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P., Cullum, J. (1993).** The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol Gen Genet* **241**, 255-262.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996).** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* **21**, 77-96.
- Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P. & Cullum, J. (1993).** The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol Gen Genet* **241**, 255-262.
- Redenbach, M., Kleinert, E. & Stoll, A. (2000).** Identification of DNA amplifications near the center of the *Streptomyces coelicolor* M145 chromosome. *FEMS Microbiol Lett* **191**, 123-129.
- Richardson, M. A., Kuhstoss, S., Huber, M. L., Ford, L., Godfrey, O., Turner, J. R. & Rao, R. N. (1990).** Cloning of spiramycin biosynthetic genes and their use in constructing *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in spiramycin biosynthesis. *J Bacteriol* **172**, 3790-3798.
- Rocha, E. P. & Blanchard, A. (2002).** Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Res* **30**, 2031-2042.
- Romero, D. & Palacios, R. (1997).** Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **31**, 91-111.
- Rosche, W. A. & Foster, P. L. (1999).** The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6862-6867.
- Rosenbluh, A. & Rosenberg, E. (1990).** Role of autocide AMI in development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **172**, 4307-4314.
- Roth, V., Aigle, B., Bunet, R., Wenner, T., Fourrier, C., Decaris, B. & Leblond, P. (2004).** Differential and cross-transcriptional control of duplicated genes encoding alternative sigma factors in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol* **186**, 5355-5365.

- Ryding, N. J., Kelemen, G. H., Whatling, C. A., Flardh, K., Buttner, M. J. & Chater, K. F. (1998).** A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **29**, 343-357.
- Saint Girons, I., Norris, S. J., Gobel, U., Meyer, J., Walker, E. M. & Zuerner, R. (1992).** Genome structure of spirochetes. *Res Microbiol* **143**, 615-621.
- Samson, L. (1992).** The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes. *Mol Microbiol* **6**, 825-831.
- Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. & Achtman, M. (1994).** Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol* **13**, 207-217.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G. & Engelberg-Kulka, H. (2001).** Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* **183**, 2041-2045.
- Saunders, N. J., Peden, J. F., Hood, D. W. & Moxon, E. R. (1998).** Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol* **27**, 1091-1098.
- Saunders, N. J., Jeffries, A. C., Peden, J. F., Hood, D. W., Tettelin, H., Rappuoli, R. & Moxon, E. R. (2000).** Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol* **37**, 207-215.
- Schaaper, R. M. (1993).** The mutational specificity of two *Escherichia coli* dnaE antimutator alleles as determined from lacI mutation spectra. *Genetics* **134**, 1031-1038.
- Schaaper, R. M. (1998).** Antimutator mutants in bacteriophage T4 and *Escherichia coli*. *Genetics* **148**, 1579-1585.
- Schaaper, R. M. & Dunn, R. L. (1987).** *Escherichia coli* mutT mutator effect during in vitro DNA synthesis. Enhanced A.G replicational errors. *J Biol Chem* **262**, 16267-16270.
- Schaaper, R. M. & Radman, M. (1989).** The extreme mutator effect of *Escherichia coli* mutD5 results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors. *Embo J* **8**, 3511-3516.

- Schauner, C., Dary, A., Lebrihi, A., Leblond, P., Decaris, B. & Germain, P. (1999).** Modulation of lipid metabolism and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* unstable mutants. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2730-2737.
- Schmidt, K. D., Tummler, B. & Romling, U. (1996).** Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J Bacteriol* **178**, 85-93.
- Schofield, M. A., Agbunag, R., Michaels, M. L. & Miller, J. H. (1992).** Cloning and sequencing of *Escherichia coli* mutR shows its identity to topB, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol* **174**, 5168-5170.
- Schofield, M. J. & Hsieh, P. (2003).** DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57**, 579-608.
- Seifert, H. S. (1996).** Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation. *Mol Microbiol* **21**, 433-440.
- Shiina, T., Tanaka, K. & Takahashi, H. (1991).** Sequence of hrdB, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2): homology to principal sigma factors. *Gene* **107**, 145-148.
- Slupska, M. M., Baikalov, C., Lloyd, R. & Miller, J. H. (1996).** Mutator tRNAs are encoded by the *Escherichia coli* mutator genes mutA and mutC: a novel pathway for mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4380-4385.
- Slupska, M. M., Chiang, J. H., Luther, W. M., Stewart, J. L., Amii, L., Conrad, A. & Miller, J. H. (2000).** Genes involved in the determination of the rate of inversions at short inverted repeats. *Genes Cells* **5**, 425-437.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. & Lenski, R. E. (1997).** Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* **387**, 703-705.
- Soliveri, J., Vijgenboom, E., Granozzi, C., Plaskitt, K. A. & Chater, K. F. (1993).** Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes. *J Gen Microbiol* **139** (Pt 11), 2569-2578.
- Stephens, J. C., Artz, S. W. & Ames, B. N. (1975).** Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4389-4393.

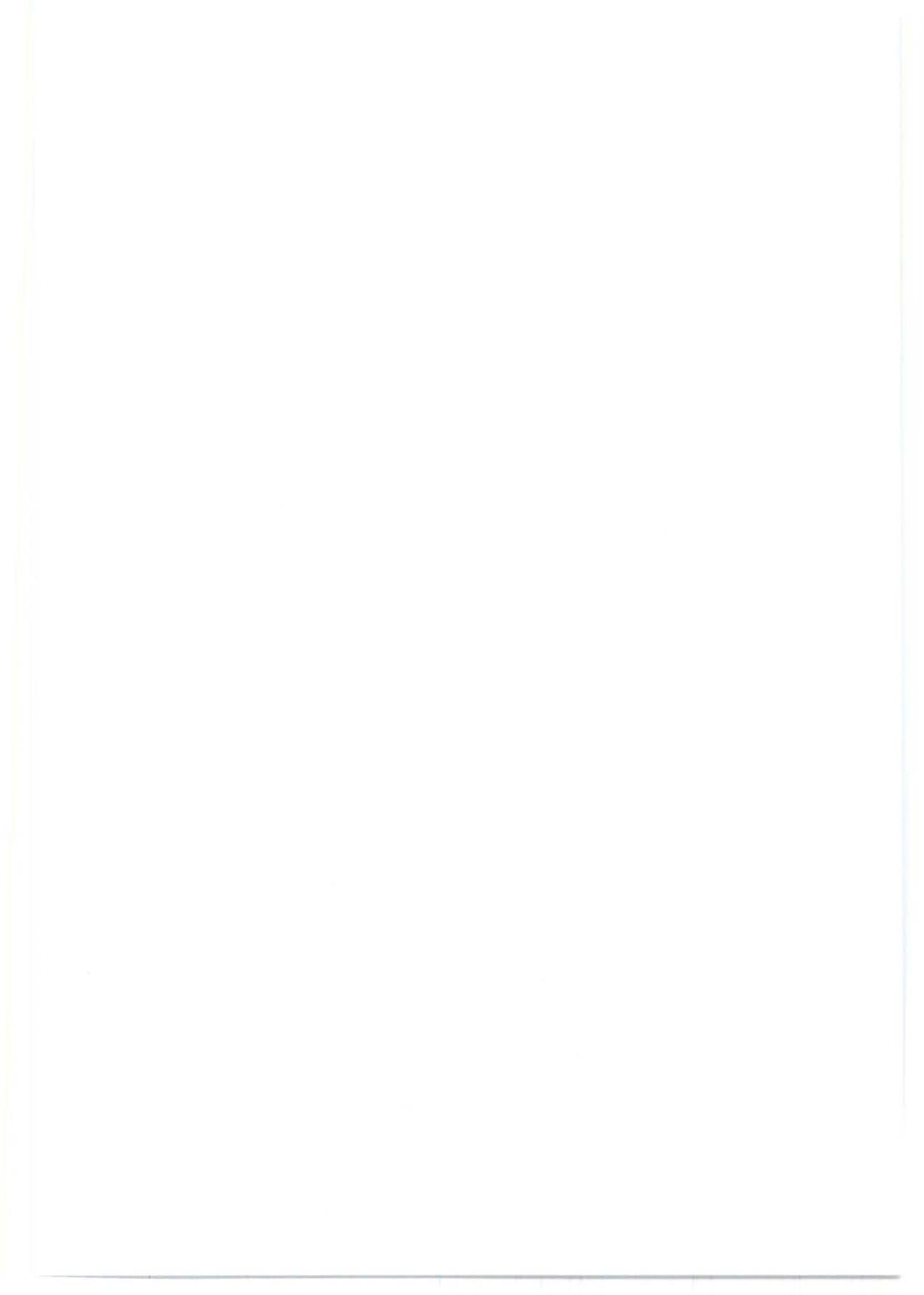
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P. & Meyer, T. F. (1986).** Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**, 61-71.
- Stevens, A. M., Shoemaker, N. B. & Salyers, A. A. (1990).** The region of a *Bacteroides* conjugal chromosomal tetracycline resistance element which is responsible for production of plasmidlike forms from unlinked chromosomal DNA might also be involved in transfer of the element. *J Bacteriol* **172**, 4271-4279.
- Stibitz, S. & Yang, M. S. (1999).** Genomic plasticity in natural populations of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **181**, 5512-5515.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.
- Storz, G., Christman, M. F., Sies, H. & Ames, B. N. (1987).** Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8917-8921.
- Sun, J., Hesketh, A. & Bibb, M. (2001).** Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **183**, 3488-3498.
- Sweasy, J. B., Witkin, E. M., Sinha, N. & Roegner-Maniscalco, V. (1990).** RecA protein of *Escherichia coli* has a third essential role in SOS mutator activity. *J Bacteriol* **172**, 3030-3036.
- Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P. H. & Godelle, B. (1997).** Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**, 700-702.
- Tam, C., Collinet, B., Lau, G., Raina, S. & Missiakas, D. (2002).** Interaction of the conserved region 4.2 of sigma(E) with the RseA anti-sigma factor. *J Biol Chem* **277**, 27282-27287.
- Tan, H. & Chater, K. F. (1993).** Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. *J Bacteriol* **175**, 933-940.
- Tan, H., Yang, H., Tian, Y., Wu, W., Whatling, C. A., Chamberlin, L. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. & Chater, K. F. (1998).** The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation. *Gene* **212**, 137-146.

- Tanaka, K., Kusano, S., Fujita, N., Ishihama, A. & Takahashi, H. (1995).** Promoter determinants for Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme containing sigma 38 (the rpoS gene product). *Nucleic Acids Res* **23**, 827-834.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. & Goodman, M. F. (1999).** UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8919-8924.
- Tatsuta, T., Joob, D. M., Calendar, R., Akiyama, Y. & Ogura, T. (2000).** Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of sigma(32). *FEBS Lett* **478**, 271-275.
- Thompson, C. J., Fink, D. & Nguyen, L. D. (2002).** Principles of microbial alchemy: insights from the Streptomyces coelicolor genome sequence. *Genome Biol* **3**, REVIEWS1020.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Torkelson, J., Harris, R. S., Lombardo, M. J., Nagendran, J., Thulin, C. & Rosenberg, S. M. (1997).** Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *Embo J* **16**, 3303-3311.
- Touloukhonov, II, Shulgina, I. & Hernandez, V. J. (2001).** Binding of the transcription effector ppGpp to Escherichia coli RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J Biol Chem* **276**, 1220-1225.
- Viala, J., Rapoport, G. & Mazodier, P. (2000).** The clpP multigenic family in Streptomyces lividans: conditional expression of the clpP3 clpP4 operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol Microbiol* **38**, 602-612.
- Viala, J., Mazodier, P. (2003).** The ATPase ClpX is conditionally involved in the morphological differentiation of Streptomyces lividans. *Mol Genet Genomics* **268**, 563-569.
- Viollier, P. H., Weihofen, A., Folcher, M. & Thompson, C. J. (2003).** Post-transcriptional regulation of the Streptomyces coelicolor stress responsive sigma factor, SigH, involves translational control, proteolytic processing, and an anti-sigma factor homolog. *J Mol Biol* **325**, 637-649.

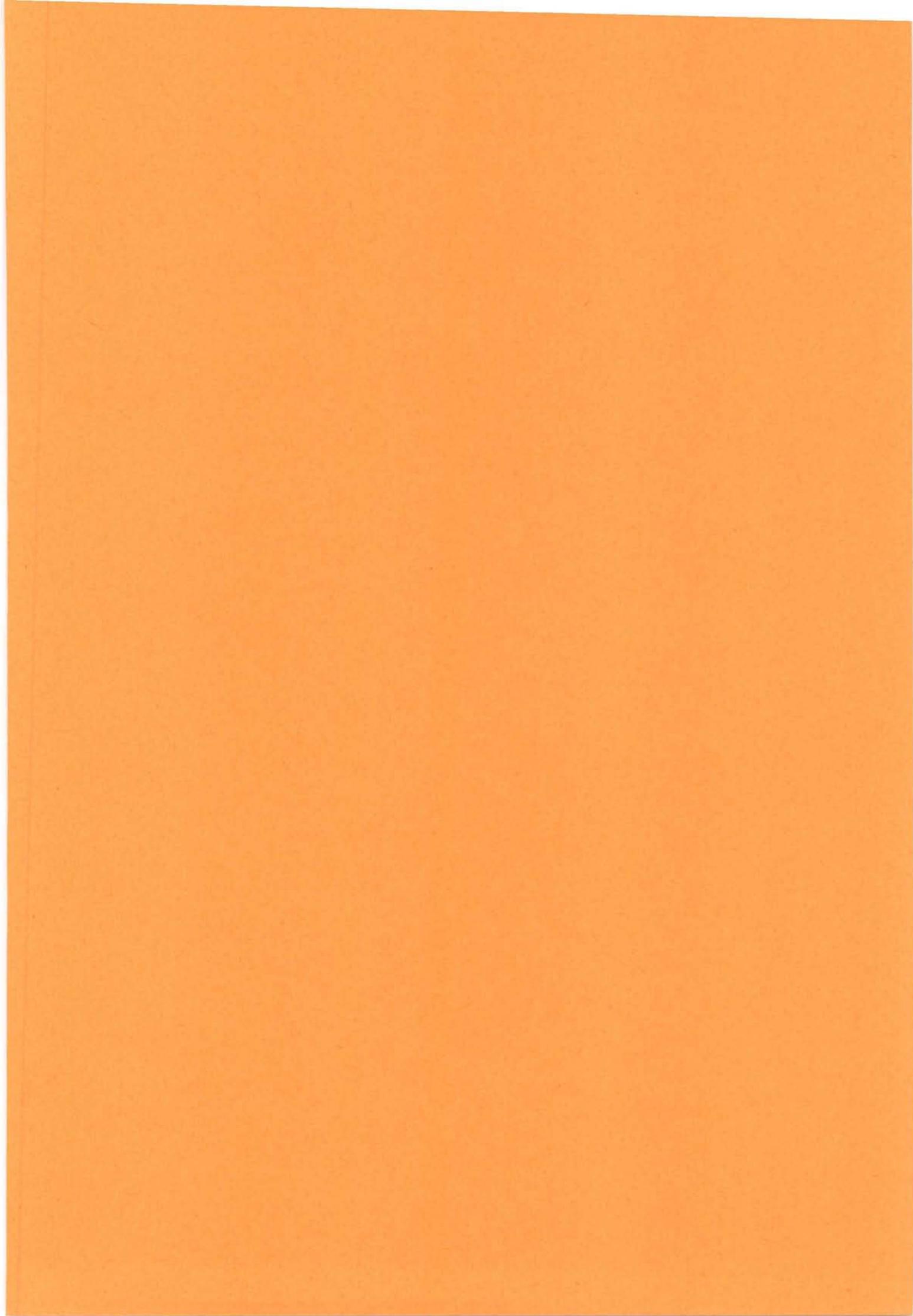
- Voelker, U., Voelker, A. & Haldenwang, W. G. (1996).** Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigma B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J Bacteriol* **178**, 5456-5463.
- Volff, J. N. & Altenbuchner, J. (1997).** Influence of disruption of the *recA* gene on genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **179**, 2440-2445.
- Volff, J. N. & Altenbuchner, J. (2000).** The 1-kb-repeat-encoded DNA-binding protein as repressor of an alpha-glucosidase operon flanking the amplifiable sequence AUD1 of *Streptomyces lividans*. *Microbiology* **146 (Pt 4)**, 923-933.
- Volff, J. N., Eichenseer, C., Viell, P., Piendl, W. & Altenbuchner, J. (1996).** Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol Microbiol* **21**, 1037-1047.
- Volff, J.N. (1994).** Stimulation de l'instabilité génétique et des réarrangements génomiques chez *Streptomyces ambofaciens*. Thèse, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy1, Nancy.
- Volker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Volker, A., Schmid, R., Mach, H. & Hecker, M. (1994).** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140 (Pt 4)**, 741-752.
- Voskuil, M. I., Voepel, K. & Chambliss, G. H. (1995).** The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**, 271-279.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R. & Susskind, M. M. (1990).** Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma 70 affecting promoter recognition. *J Mol Biol* **215**, 267-276.
- Watnick, P. I. & Kolter, R. (1999).** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**, 586-595.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2003).** Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**, 4585-4592.
- Wehmeier, L., Schafer, A., Burkovski, A., Kramer, R., Mechold, U., Malke, H., Puhler, A. & Kalinowski, J. (1998).** The role of the *Corynebacterium glutamicum* *rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology* **144 (Pt 7)**, 1853-1862.

- Welch, M. M. & McHenry, C. S. (1982).** Cloning and identification of the product of the *dnaE* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **152**, 351-356.
- Wenner, T., Roth, V., Fischer, G., Fourrier, C., Aigle, B., Decaris, B. & Leblond, P. (2003).** End-to-end fusion of linear deleted chromosomes initiates a cycle of genome instability in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Microbiol* **50**, 411-425.
- Whoriskey, S. K., Schofield, M. A. & Miller, J. H. (1991).** Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants with altered rates of deletion formation. *Genetics* **127**, 21-30.
- Willey, J., Schwedock, J. & Losick, R. (1993).** Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* **7**, 895-903.
- Wilson, C. & Dombroski, A. J. (1997).** Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **267**, 60-74.
- Witkin, E. M. (1976).** Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **40**, 869-907.
- Wolfe, K. H. & Shields, D. C. (1997).** Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713.
- Woods, D. R. & Jones, D. T. (1986).** Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Adv Microb Physiol* **28**, 1-64.
- Worth, L., Jr., Clark, S., Radman, M. & Modrich, P. (1994).** Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3238-3241.
- Wosten, M. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 127-150.
- Wright, B. E. (1996).** The effect of the stringent response on mutation rates in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **19**, 213-219.
- Wright, B. E. (1997).** Does selective gene activation direct evolution? *FEBS Lett* **402**, 4-8.
- Wright, B. E. (2000).** A biochemical mechanism for nonrandom mutations and evolution. *J Bacteriol* **182**, 2993-3001.

- Wright, B. E., Longacre, A. & Reimers, J. M. (1999).** Hypermutation in derepressed operons of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5089-5094.
- Wu, S., de Lencastre, H. & Tomasz, A. (1996).** Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* **178**, 6036-6042.
- Wu, T. H., Clarke, C. H. & Marinus, M. G. (1990).** Specificity of *Escherichia coli* mutD and mutL mutator strains. *Gene* **87**, 1-5.
- Yamaguchi, M., Dao, V. & Modrich, P. (1998).** MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J Biol Chem* **273**, 9197-9201.
- Yanofsky, C., Cox, E. C. & Horn, V. (1966).** The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 274-281.
- Young, M. & Cullum, J. (1987).** A plausible mechanism for large-scale chromosomal DNA amplification in streptomycetes. *FEBS Lett* **212**, 10-14.
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993).** Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **47**, 321-350.
- Zhang, J. R. & Norris, S. J. (1998).** Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene vlsE involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect Immun* **66**, 3698-3704.
- Zhang, Q. M., Ishikawa, N., Nakahara, T. & Yonei, S. (1998).** *Escherichia coli* MutY protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine:guanine mispair to prevent spontaneous G:C-->C:G transversions. *Nucleic Acids Res* **26**, 4669-4675.
- Zhao, J. & Winkler, M. E. (2000).** Reduction of GC --> TA transversion mutation by overexpression of MutS in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**, 5025-5028.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F. & Hacker, J. (1999).** A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**, 345-356.



V. ANNEXES



Affiche n°1

Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.

Identification d'une nouvelle séquence amplifiable localisée aux extrémités du chromosome de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Colloque 3R (Réplication-Recombinaison-Réparation), Gif sur Yvette, juin 2001.

Affiche n°2

Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B. et Dary A.

Identification of a new amplifiable unit of DNA located in the Terminal Inverted repeats of the chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

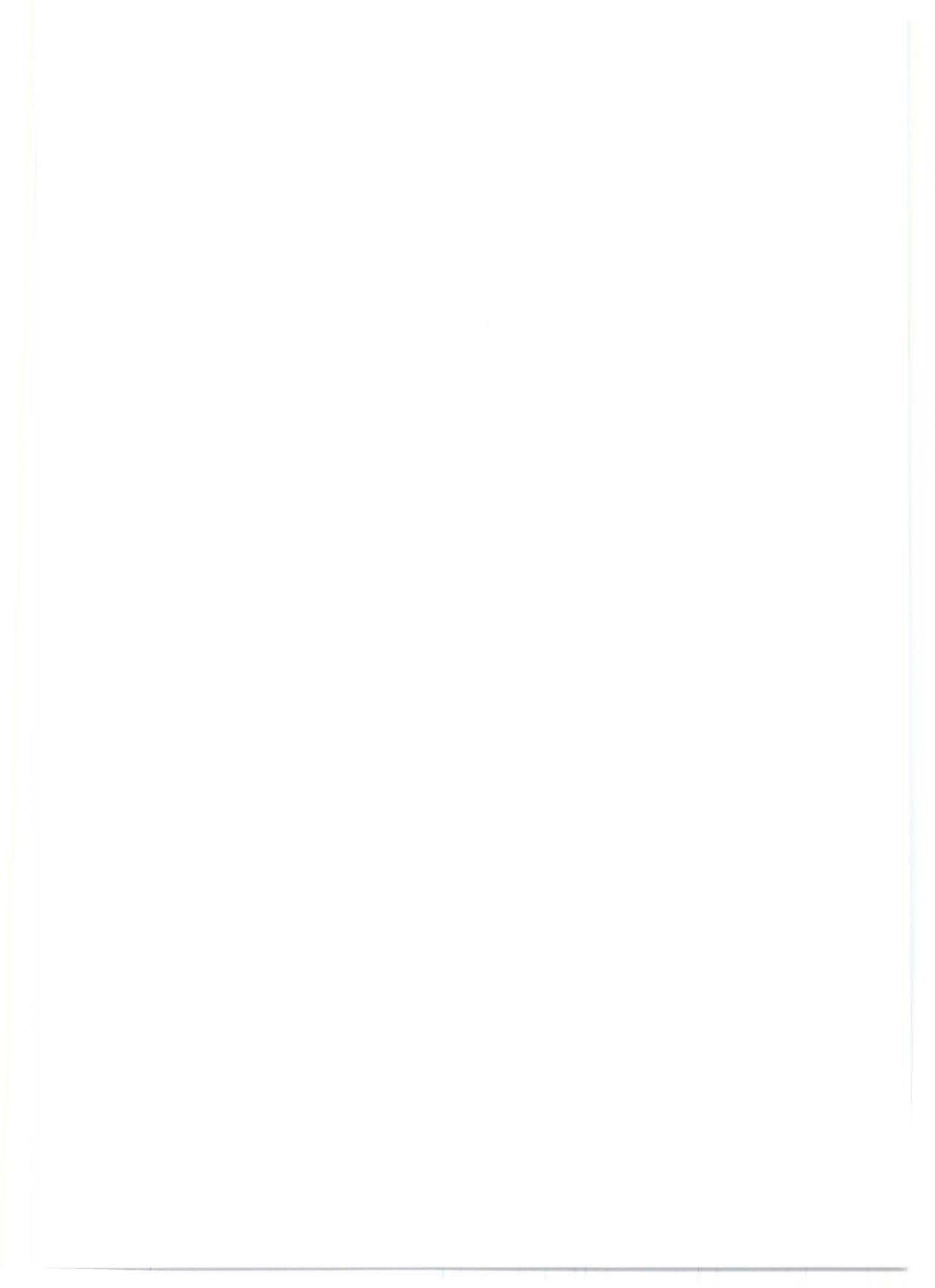
ISBA, Vancouver (Canada), août 2001.

Affiche n°3

Catakli S., André A., Decaris B. et Dary A.

Genetic instability events occurring during the development of the colony produce at high frequency a particular class of Whi mutants in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

International congress of bacteriology, Paris, juin 2002.



Identification d'une nouvelle séquence amplifiable localisée aux extrémités du chromosome de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877



Catakli S., André A., Leblond P., Decaris B., Dary A.



Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences de l'Université Henri Poincaré de Nancy I, UMR INRA 1128, IFR 110, Vandoeuvre lès nancy, France.

Chez *S. ambofaciens*, l'instabilité génétique affecte la pigmentation des colonies.

La majorité des mutants présente des réarrangements génomiques tels que des délétions pouvant atteindre un quart du génome. Ces délétions sont souvent associées à des amplifications de séquences particulières du génome appelées AUD pour Amplifiable Unit of DNA. Tous les réarrangements génomiques décrits ont été localisés aux extrémités de l'ADN chromosomique. Ce chromosome est linéaire, mesure 8000 kb et se termine par des séquences inversées terminales appelées TIRs pour Terminal Inverted Repeats (210 kb). Cependant, une classe particulière de mutants nommées Pig_{pap} produits au cours de la différenciation du mycélium aérien, ne présente aucun réarrangement détectable.

Le phénotype mutant est dépigmenté le phénotype sauvage est pigmenté gris



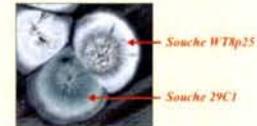
Dans le but d'identifier le ou les gènes mutés chez cette classe de mutant, la restauration du phénotype sauvage a été recherchée par complémentation fonctionnelle d'un mutant Pig_{pap} nommée WT8p25. Au cours de cette recherche la souche 29C1 a été isolée...

La souche 29C1...

... présente un phénotype particulier

Les colonies produites par la souche 29C1 présentent une pigmentation verte. Ce pigment vert est excrété dans le milieu de culture. Comme cette pigmentation n'avait jamais été observée jusqu'à présent chez *S. ambofaciens*, un ribotypage a été effectué et a démontré qu'il s'agissait bien de la souche étudiée.

Les colonies sont vertes ...

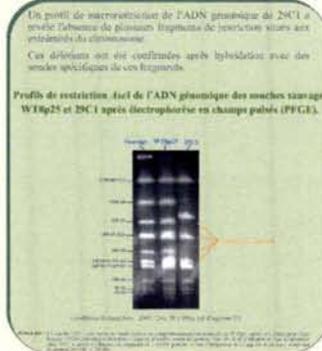


... présente de grands réarrangements génomiques

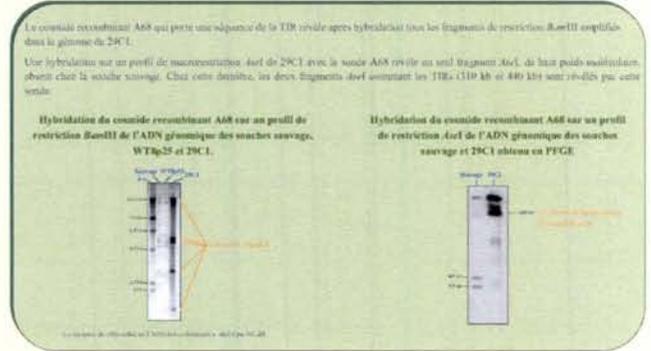
Une amplification



Une délétion



Localisation de l'amplification

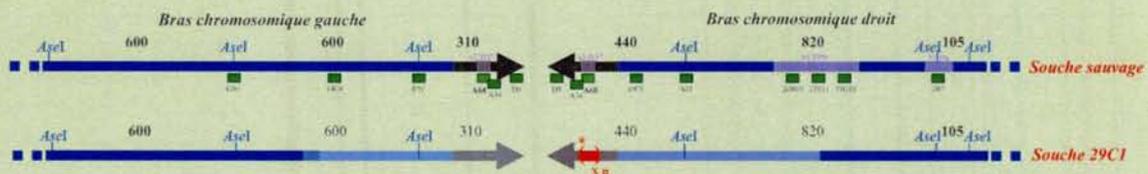


Une nouvelle région amplifiable chez *S. ambofaciens*

Jusqu'à présent, chez *S. ambofaciens*, toutes les amplifications décrites ont été localisées dans deux régions situées sur le bras droit du chromosome, nommées AUD6 et AUD90. Ainsi, une nouvelle séquence amplifiable, nommée AUD37, a été localisée au niveau des répétitions terminales inversées, TIRs du chromosome. De plus, des délétions de part et d'autre d'une amplification n'avaient jamais été observées.

Les résultats moléculaires obtenus avec la souche 29C1 ont permis d'établir une carte de restriction AseI des extrémités du chromosome de cette souche. Sur cette carte ont été indiquées les sondes utilisées pour caractériser les délétions au niveau des extrémités du chromosome. Etant donné que la séquence révélée par A68 est dupliquée car située dans les TIRs, la localisation de l'amplification chez 29C1 sur la TIR droite ne peut être qu'arbitraire.

Carte de macrorestriction AseI des extrémités du chromosome des souches sauvage et 29C1

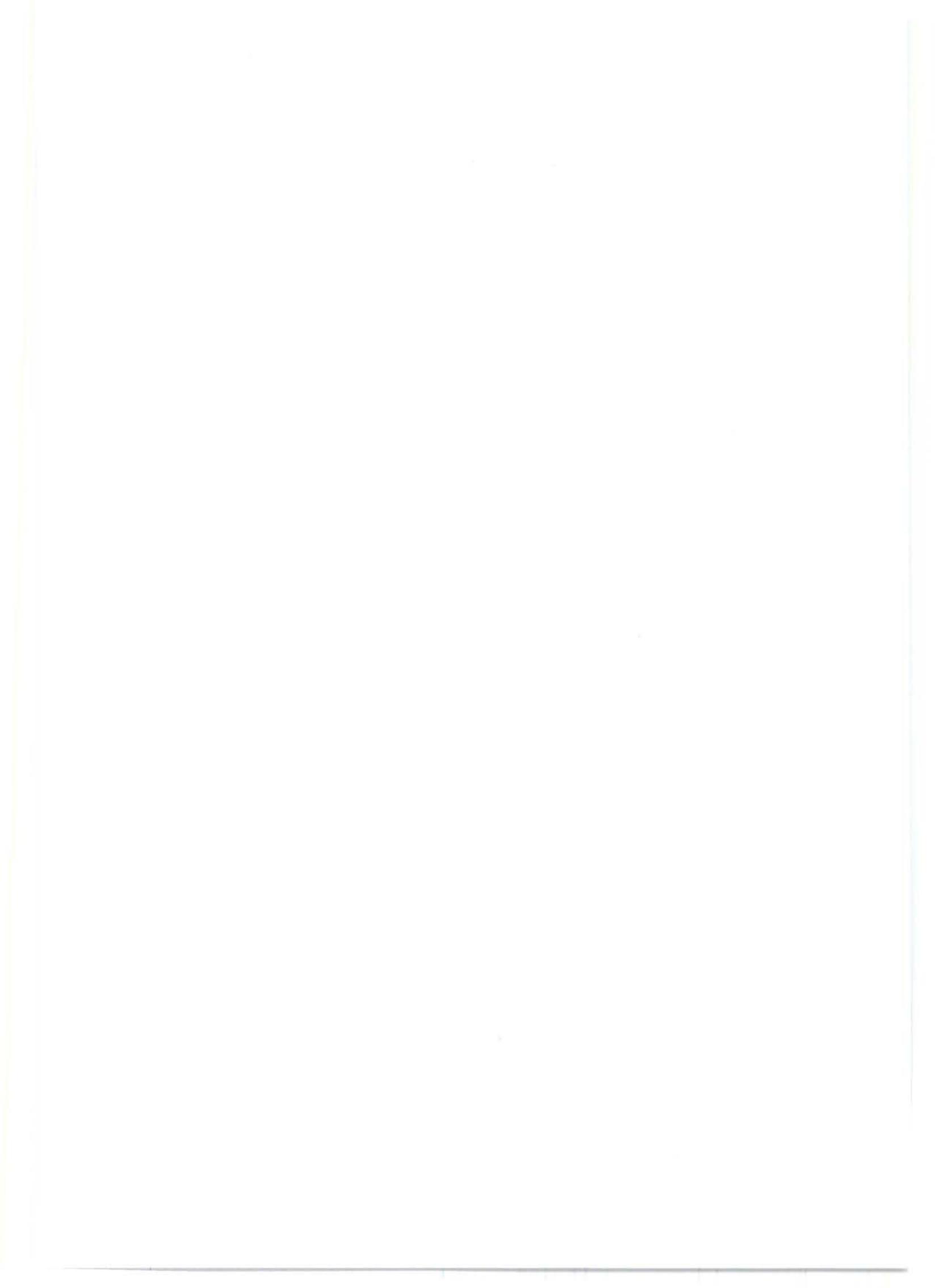


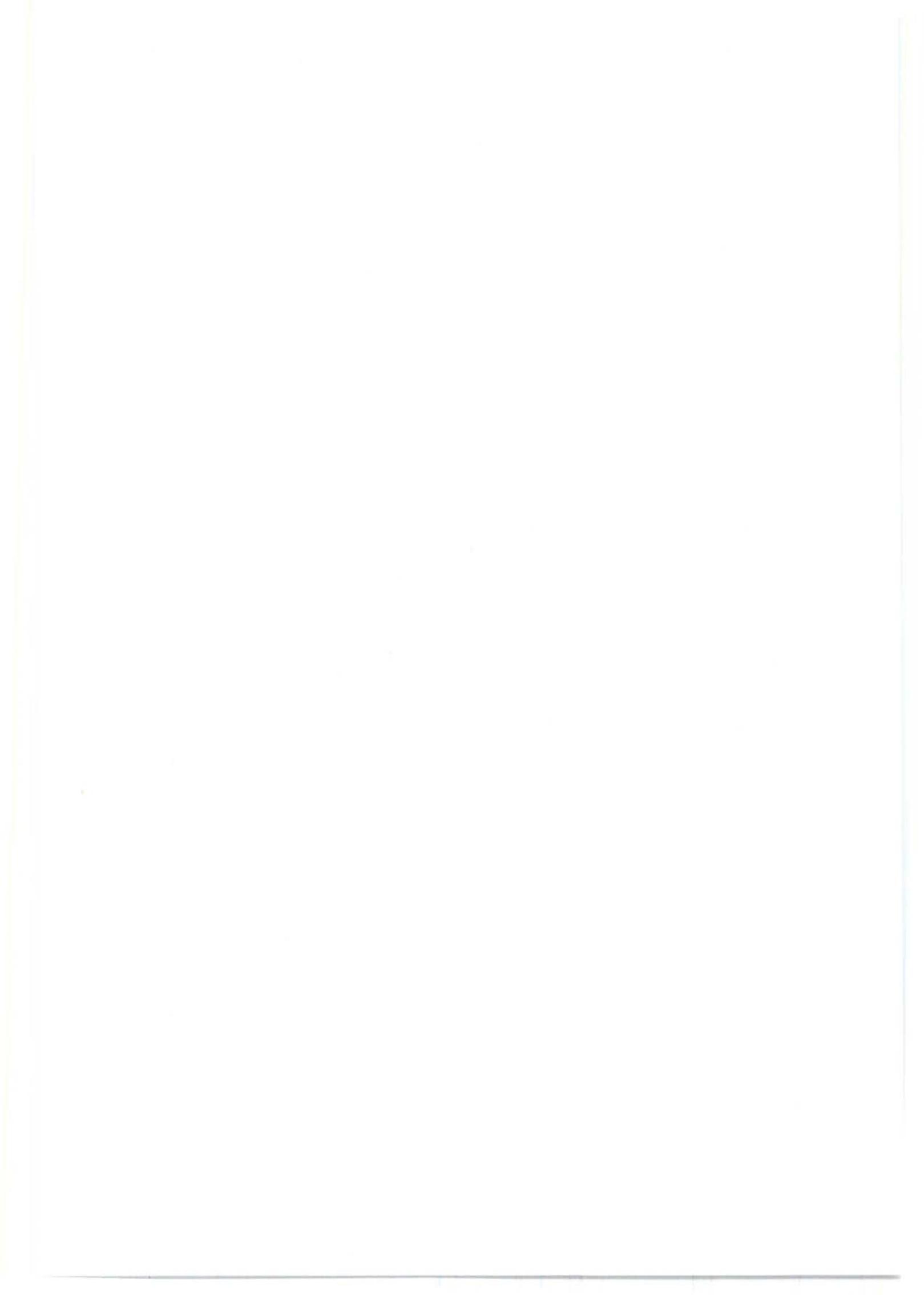
Tous ces résultats suggèrent une circularisation du chromosome ...



... Quelles sont les perspectives ?

Est-ce que cette nouvelle structure est stable?
Est-ce que la production d'un nouveau pigment vert est liée à ces réarrangements génomiques?





Genetic instability events occurring during the development of the colony produce at high frequency a particular class of Whi mutants in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Sibel CATAKLI, Axelle ANDRE, Bernard DECARIS and Annie DARY

Laboratoire de Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences de l'Université Henri Poincaré de Nancy 1, UMR INRA 1128, IFR 110, Vandoeuvre lès nancy, France.



Figure 1:



Streptomyces undergoes a complex cycle of morphological differentiation (Fig.1). Long chains of pigmented spores are produced on aerial hyphae which grow out the vegetative mycelium. Mutants defective in sporulation and in production of the spore-specific grey pigment are named Whi mutants in *Streptomyces coelicolor*.

In *Streptomyces ambofaciens*, genetic instability affects colony pigmentation (Fig.2).

This instability generates a high degree of polymorphism consisting of four phenotypes: pigmented colonies named Pig⁺, pigment-defective colonies called Pig^{-col}, pigmented colonies with white sector (Pig⁺sec) or white papillae (Pig⁺pap).

Figure 2:

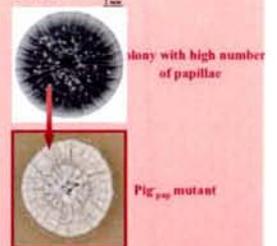


Phenotypic characteristic of the Whi mutants named Pig^{-pap}

In *S. ambofaciens*, the mutants deriving from white papillae harbour a Whi mutant phenotype (Fig.3).

Pigment-defective papillae can be produced at high frequency on the surface of the colony and might arise from a mutational event occurring during formation of the aerial mycelium. The mutants deriving from papillae are named Pig^{-pap}. Phenotypically, the Pig^{-pap} mutants do not generate normal spores and remain white after prolonged incubation.

Figure 3:

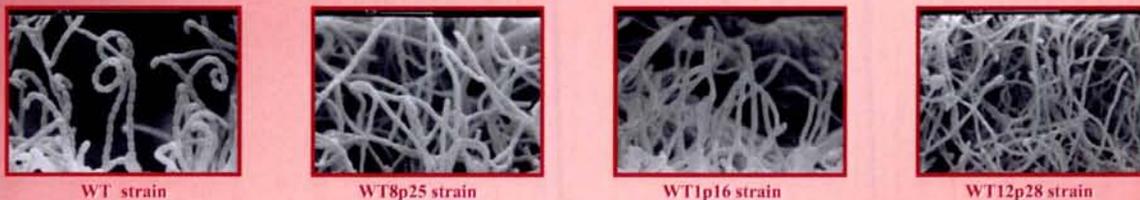


Microscopical analyses were realized in order to specify the phenotype of three Pig^{-pap} mutants named WT8p25, WT1p16 and WT12p28 deriving from independent mutational event (Fig.4).

Scanning electron micrographs analyses revealed that these mutants produced long straight aerial hyphae without any septation contrary to the Wild-Type (WT) strain which produced long spores chains.

Thus, the Pig^{-pap} mutants were blocked at the first step of the aerial mycelium formation.

Figure 4:



Complementation of the Pig^{-pap} mutants

In order to identify the genetic determinism of the Pig^{-pap} mutants, we tried to complement the mutant phenotype by introducing five *whi* genes identified in *Streptomyces coelicolor*: *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* and *whiJ*. These genes are required for sporulation septation of aerial hyphae. Mutants of each *whi* gene have a characteristic aerial hyphae conformation and it appeared that a *whiG* mutant harboured a phenotype similar to the Pig^{-pap} mutant phenotype (Fig.5).

The introduction of *whiA*, *whiB*, *whiH* or *whiJ* by conjugation in the three mutants Pig^{-pap} did not restore the WT phenotype.

The introduction of *whiG* in the three mutants Pig^{-pap} restored both sporulation and pigmentation (Fig.6). For the WT12p28 strain, it must be noted that a return to white papillae formation was observed.

Figure 5:

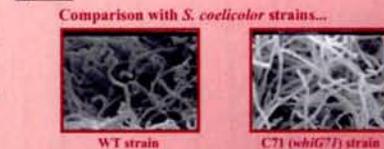


Figure 6:



Molecular characteristic of the Pig^{-pap} mutants

The *whiG* gene which encodes a RNA polymerase sigma factor in *S. coelicolor* was sequenced in the WT strain and in the three mutants of *S. ambofaciens*.

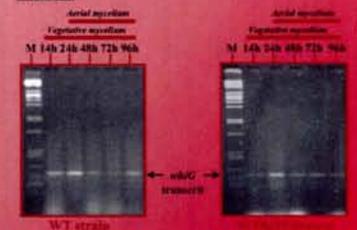
No difference between the four sequences was detected.

A transcriptional analysis was realized in order to know whether *whiG* was transcribed in the Pig^{-pap} mutant.

RNAs were isolated from surface cultures of the WT strain and WT8p25 strain at different times corresponding to different stages of development. A RT-PCR procedure displayed a fragment of 230 pb specific of a region of the *whiG* gene in the WT strain and in the WT8p25 mutant at all developmental stages (Fig.7).

Thus, *whiG* complement the mutant phenotype of the Pig^{-pap} but its sequence and its transcription in these strains are similar to the WT strain.

Figure 7:

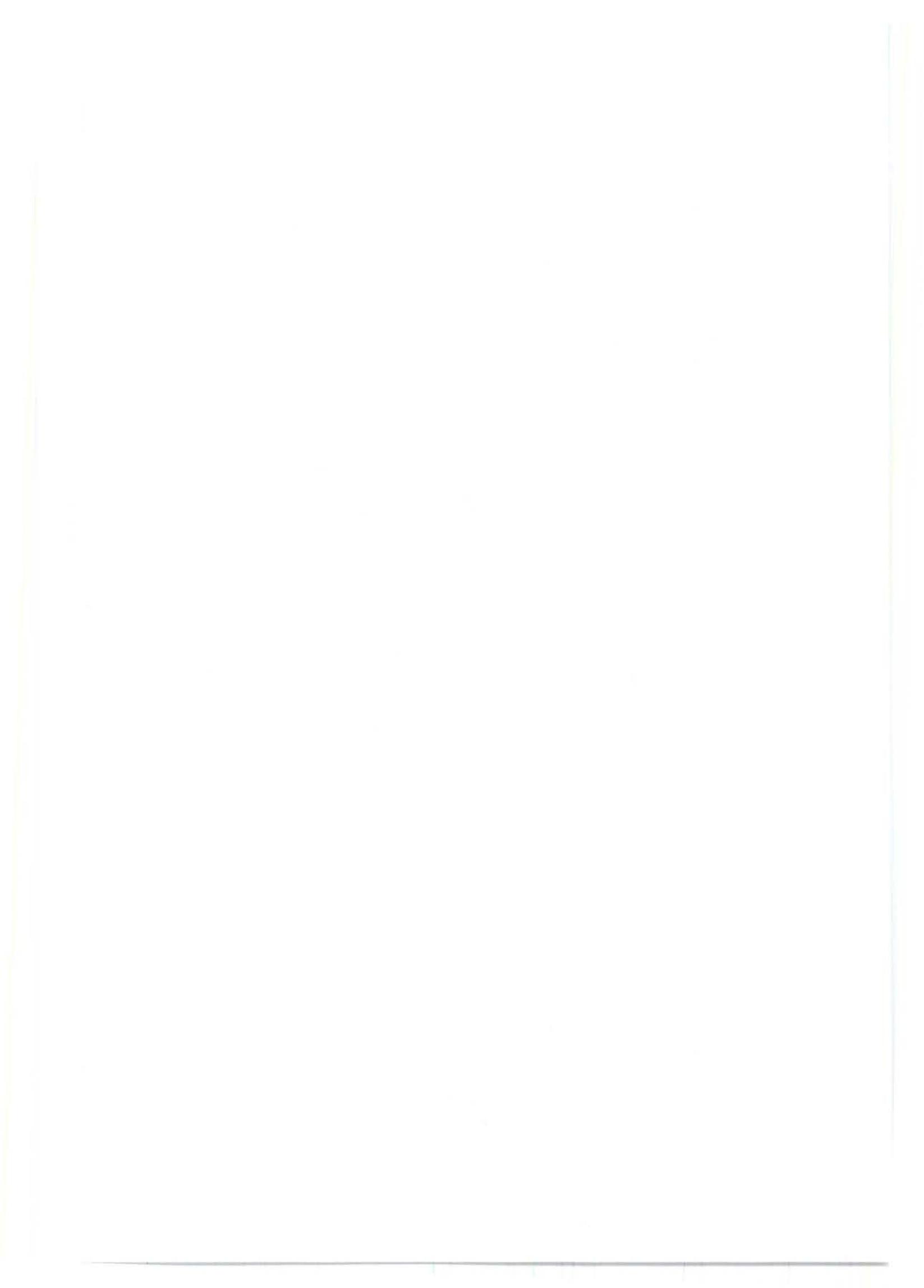


What is the genetic determinism of the Pig^{-pap} mutants ?

These results mainly raise two questions:

Do the mutational phenomenon affect a regulator or a target gene of *whiG*?

Do the mutational phenomenon affect the transcriptional level or the translation of *whiG*?



Communication orale n°1

Catakli S., André A., Decaris B. et Dary A.

Les papilles dépigmentées produites au cours du développement chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 sont des mutants *whi*.

Rencontre du club des Actinomycètes, Nancy, 6-7 mai 2002.

Communication orale n°2

Catakli S., Andrieux A., Decaris B. et Dary A.

A mutational phenomenon affecting the regulation of the WhiG sigma factor takes place during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Biology of Streptomyces and related Actinomycetes, Münster (Germany), 27 février- 3 mars 2003.

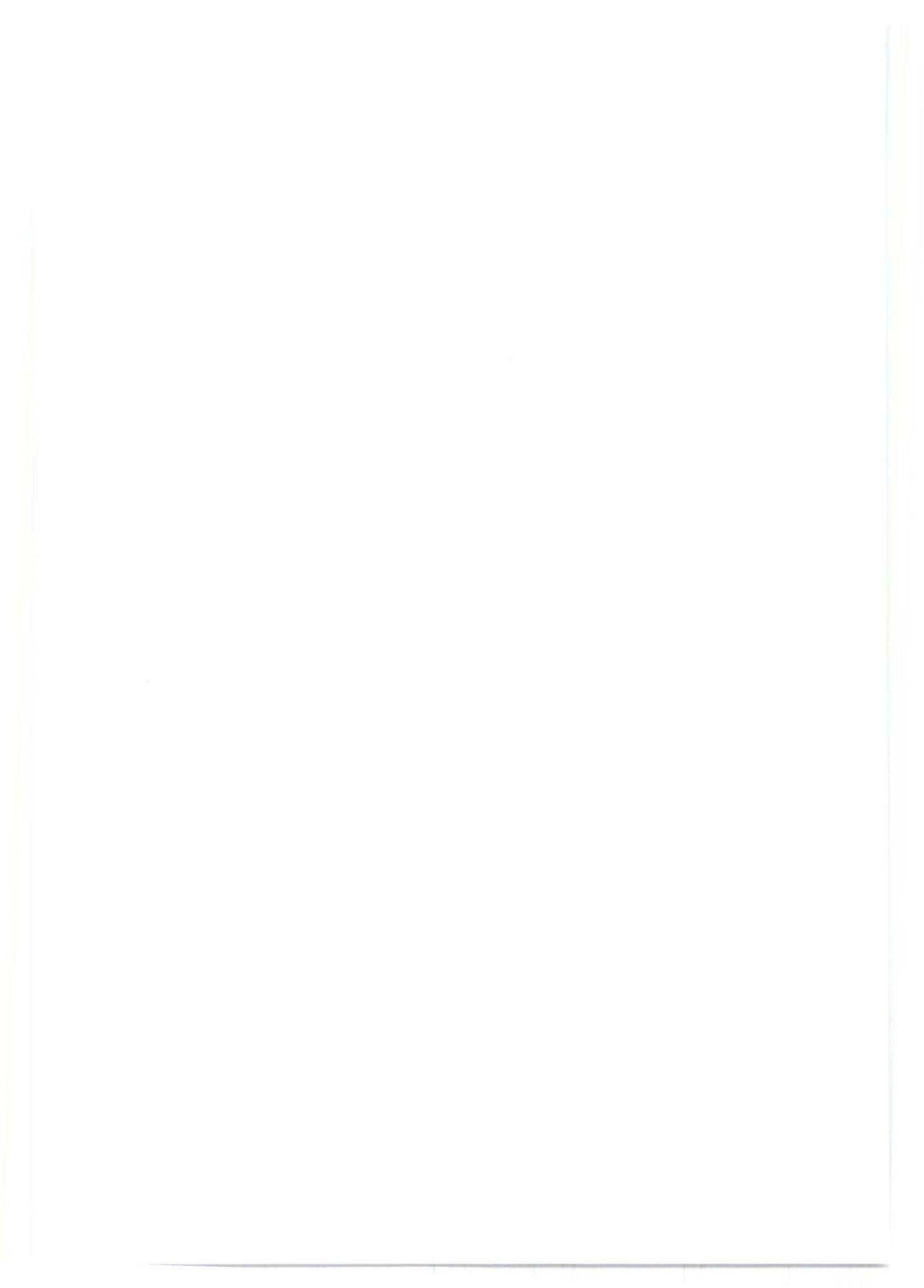
Communication orale n°3

Genay M., Catakli S., Decaris B. et Dary A.

Modulation de l'instabilité génétique au cours du développement de *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces coelicolor* par les nutriments.

Rencontre du club des Actinomycètes, Liège, 6-7 mai 2004.

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

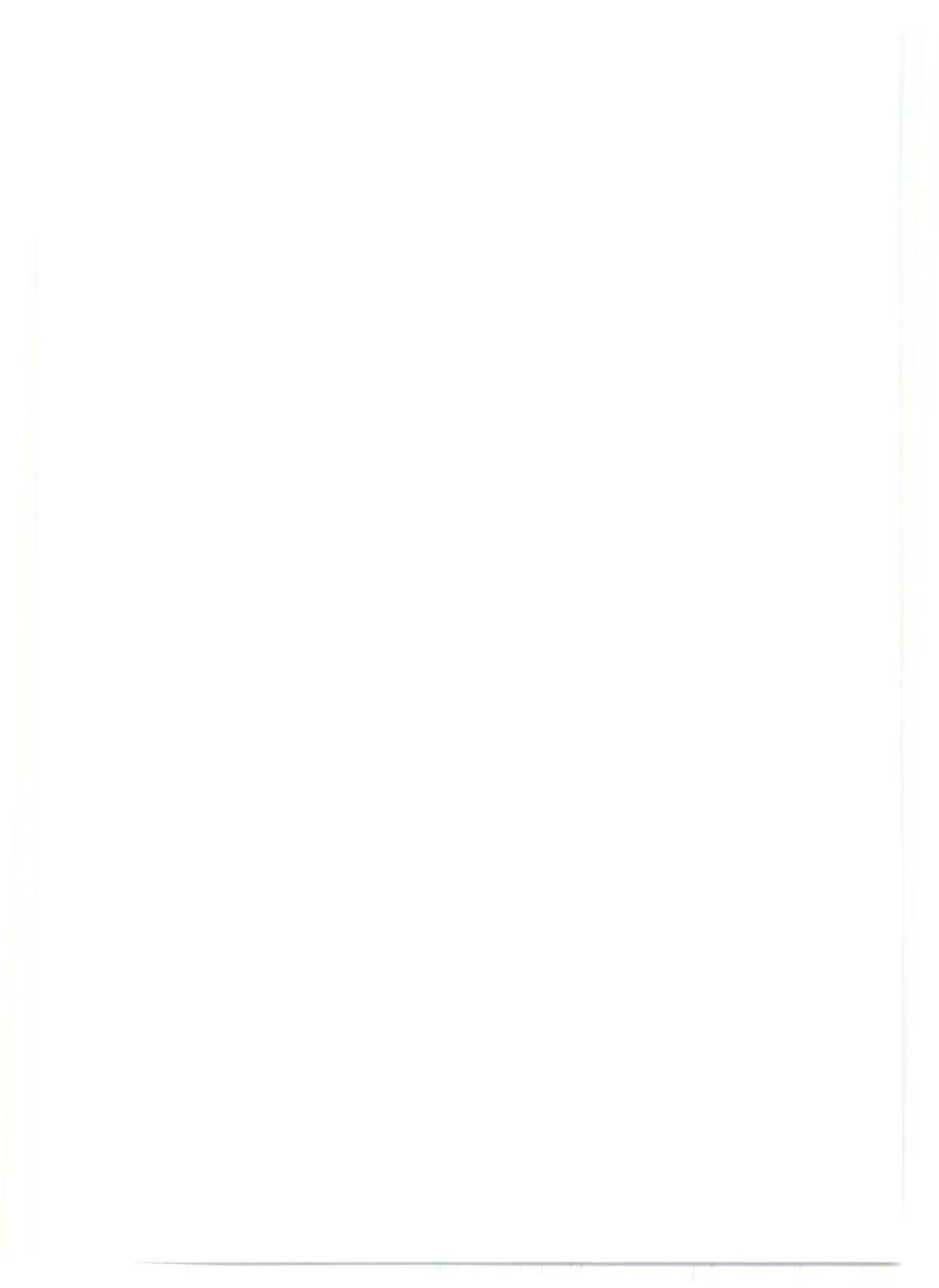


Etude des mutants *whi* de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877

Sibel Catakli , Axelle André, Annie Dary et Bernard Decaris

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA 1128 – IFR 110, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

L'instabilité génétique observée chez *Streptomyces ambofaciens* affecte la pigmentation des colonies. Au cours du développement de la colonie, différents mutants dépigmentés apparaissent à différents stades du développement. Les papilles dépigmentées seraient issus d'événements mutationnels survenus lors de la différenciation du mycélium aérien. Ces papilles donnent naissance après repiquage à des mutants nommés $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$. Ces mutants sont totalement dépigmentés et ne sporulent pas. Par ailleurs, contrairement aux autres mutants dépigmentés, cette classe de mutant ne présente aucun réarrangement génomique de grande taille. Dans le but d'identifier les gènes cibles de l'instabilité génétique, trois mutants $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ ont été choisis pour des essais de complémentation fonctionnelle avec cinq gènes *whi* connus pour être impliqués dans la cascade de régulation de la sporulation et de la pigmentation chez *S. coelicolor*. Ces gènes ont été introduits par conjugaison interspécifique entre *Escherichia coli* et chacun de ces trois mutants. Les résultats montrent que l'introduction du gène *whiG*, codant un facteur sigma chez *S. coelicolor*, permet la restauration de la pigmentation et de la sporulation chez ces trois mutants. La séquence de ce gène a été établie chez la souche sauvage et chez les trois mutants $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ et indique que le gène *whiG* n'est pas muté chez ces mutants. Au niveau transcriptionnel, la méthode de RT-PCR utilisant des oligonucléotides spécifiques du gène *whiG*, a permis de mettre en évidence un transcrit à différents stades du développement chez la souche sauvage et chez les trois souches mutantes. Une expérience de PCR quantitative est envisagée dans le but de déterminer le taux de transcription de ce gène chez les différentes souches.

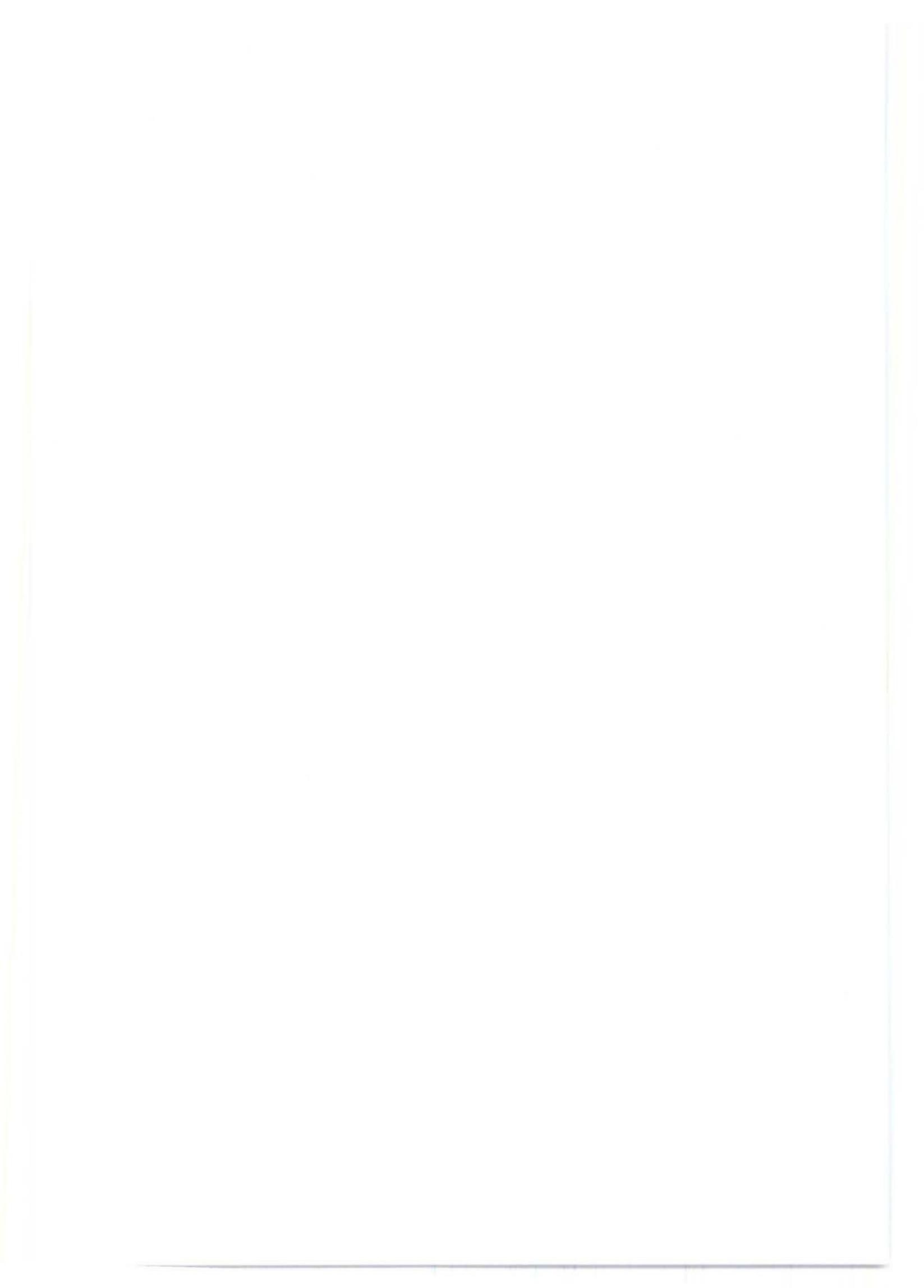


A mutational phenomenon affecting the WhiG sigma factor regulation takes place during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877

Catakli Sibel, Andrieux Axelle, Decaris Bernard, Dary Annie

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA 1128 – IFR 110, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Streptomyces ambofaciens harbours a high degree of genetic instability which affects the pigmentation of the colonies. Different classes of mutants are generated at different stages of the developmental cycle. Most particularly, pigmented colonies harbouring a variable number of white papillae are observed. Papillae are thought to result from a mutational event occurring during aerial mycelium formation. We were interested in the characterization of the mutants deriving from papillae. These mutants, named $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$, constitute a new aspect of genetic instability. They are white, do not sporulate and do not contain any large genome rearrangement. Observation in MEB of three mutants $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$, deriving from three independent mutational events, revealed that they are blocked at the beginning of the aerial mycelium formation. In order to complement their phenotype, we introduced five genes *whi* (*whiA*, *whiB*, *whiH*, *whiG* and *whiJ*) known to be involved in the regulation cascade of sporulation in *S. coelicolor*. It appeared that only *whiG* restored the pigmentation and the sporulation of the three mutants. Sequence analyses of the *whiG* gene of the wild-type strain and the three mutants did not reveal any DNA sequence difference. Transcriptional analyses of *whiG*, using quantitative RT-PCR method, were realized in the wild-type and the three mutants and revealed a transcript of *whiG* in each strain. Thus, these results show that the regulation of *whiG* is modified in the three $\text{Pig}^-_{\text{pap}}$ mutants. In order to know whether *whiG* is translated in the mutants, western blot analyses are at present performed.



Modulation de l'instabilité génétique au cours du développement de *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces coelicolor* par les nutriments

M. GENAY, S. CATAKLI, A. DARY, B. DECARIS

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA 1128 – IFR 110, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy 1, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

L'instabilité génétique observée chez *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces coelicolor* affecte la pigmentation des colonies. L'étude de mutants appelés Pig-pap, issus de papilles dépigmentées apparaissant au cours du développement du mycélium aérien, montre qu'ils sont dépourvus de réarrangements génomiques. Ces mutants sont bloqués très tôt au cours du processus de sporulation et cette déficience peut être complétée par l'introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor*. Ce gène code un facteur sigma indispensable aux premières étapes du processus de sporulation. Le nombre d'événements mutationnels estimé par le nombre de papilles varie suivant le milieu de croissance de *S. ambofaciens*.

Afin de préciser les éléments responsables de cette influence, différents milieux de culture ont été élaborés et la distribution du nombre de papilles mutantes par colonie a été déterminée. Il a ainsi été observé que l'apparition de mutants dépigmentés à la surface des colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* est d'autant plus fréquente que la quantité en acides aminés dans le milieu est faible. A l'inverse, en présence d'une forte concentration d'acides aminés dans le milieu, les colonies ne présentent pas, ou très peu, de mutants. Lorsque les papilles mutantes sont repiquées, elles donnent naissance à des mutants Pig-pap. La caractérisation de tels mutants a révélé qu'ils sont également dépourvus de réarrangements génomiques et présentent un phénotype similaire à ceux décrits antérieurement. Dans la mesure où la limitation en acides aminés semble responsable de l'augmentation de la production de mutants Pig-pap, nous avons testé la possible implication de la réponse stringente dans l'induction de l'instabilité génétique observée sur des milieux limités en nutriments.

Titre : Action de facteurs génétiques et environnementaux sur la dynamique mutationnelle au cours de la différenciation chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Résumé : Des mutants issus de l'instabilité génétique chez *Streptomyces ambofaciens* appelés Pig-pap ont été caractérisés. L'analyse du chromosome de la souche 29C1 a révélé un nouveau type de réarrangement associé à la production d'un pigment vert. Les mutants Pig-pap dépigmentés et non sporulants sont issus de papilles sur les colonies. L'introduction du gène *whiG* codant un facteur sigma permet le retour à la sporulation et à la pigmentation. Ce gène n'est pas muté et est transcrit chez ces mutants. Le gène *whiH* dont la transcription dépend de WhiG n'est pas transcrit. WhiG ne serait pas fonctionnel et une modification post-transcriptionnelle de *whiG* aboutirait au phénotype Pig-pap. L'analyse de mutants issus d'un transconjugant a montré que le transgène *whiG* constitue une cible mutationnelle. De plus, la production de ces mutants est augmentée lors d'une carence en acides aminés et un mutant *relA* ne produit pas de papille, impliquant la réponse stringente dans ce phénomène.

Title : Effect of genetic and environmental factors on the mutational dynamic during the differentiation of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877.

Abstract : In *Streptomyces ambofaciens*, mutants generated by genetic instability and named Pig-pap were characterised. Analyses of the chromosome of the 29C1 strain revealed a new type of rearrangement associated to the production of a green pigment. The Pig-pap mutants, pigment and spore deficient, derived from papillae on the colonies. The introduction of the *whiG* gene coding a sigma factor restored sporulation and pigmentation. In these mutants, this gene is not mutated and is transcribed. *whiH* gene whose transcription depends on WhiG is not transcribed. WhiG would be not functional and a post-transcriptional modification could be responsible of the Pig-pap phenotype. Study of mutants derived from a transconjugant showed that the *whiG* transgene constitute a target of mutations. More, the production of mutants is increased during a amino acids limitation and a *relA* mutant does not produce papilla, implicating the stringent response in this phenomenon.

RESUME

Les mutations et les mécanismes permettant aux microorganismes de modifier leur métabolisme contribuent à leur adaptation à de brusques variations environnementales mais aussi à plus long terme à l'évolution des espèces. Le taux de mutation peut ainsi varier au cours de la vie d'un individu et cette variation est assurée via l'établissement d'états mutateurs globaux ou locaux, transitoires ou héréditaires.

Les résultats obtenus au cours de cette étude s'inscrivent dans le cadre de l'étude des mécanismes et des conséquences évolutives de la dynamique mutationnelle chez *Streptomyces*, bactérie d'intérêt industriel. Cette dynamique est corrélée à la formation de grands réarrangements génomiques aux extrémités du chromosome et se caractérise par l'apparition à haute fréquence (>1%) de mutants dans la descendance d'une colonie sauvage. Dans ce travail, deux aspects de la dynamique mutationnelle ont été étudiés. Le premier concerne la mise en évidence d'une structure génomique nouvelle et le deuxième correspond à une situation encore plus originale : la phase de différenciation tardive, correspondant à la sporulation et à la pigmentation de la colonie, est hautement mutable. Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de cette dynamique mutationnelle, des mutants spontanés, dépigmentés et non sporulants, appelés Pig-pap, ont été caractérisés.

L'analyse de la structure du chromosome de la souche 29C1, issue de l'instabilité génétique, a permis de mettre en évidence un nouveau type de réarrangement chez *Streptomyces*. Son chromosome présente une amplification associée à la délétion des séquences situées de part et d'autre de la séquence amplifiée, aboutissant ainsi à la circularisation du chromosome. Par ailleurs, cette structure serait associée à la surproduction d'un nouveau métabolite pigmenté vert.

Les mutants Pig-pap qui dérivent d'événements d'instabilité détectés sur une colonie grise de *Streptomyces* sous la forme de papilles blanches seraient produits lors de la formation du mycélium aérien. Trois mutants Pig-pap de *Streptomyces ambofaciens* et trois de *Streptomyces coelicolor* ont été étudiés. Ces mutants sont bloqués dans les étapes précoces du processus de sporulation et l'introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor* qui code un facteur σ indispensable à ces étapes a permis le retour à la sporulation et à la pigmentation. De plus, pour le mutant pap3 de *S. ambofaciens* et les trois mutants de *S. coelicolor*, un retour à la production de papilles sur les colonies est observé. Aucune mutation n'a été observée dans la séquence du gène *whiG* chez les mutants analysés et le taux de transcrits *whiG* n'est pas significativement différent de celui de la souche sauvage. De plus, le gène *whiH* dont la transcription dépend du facteur σ^{WhiG} n'étant pas transcrit chez les trois mutants de *S. ambofaciens*, ces résultats suggèrent que le facteur σ^{WhiG} n'y est pas fonctionnel. Ainsi, soit une modification de *whiG* au niveau post-transcriptionnel soit un régulateur muté du facteur σ^{WhiG} tel un facteur anti- σ ou anti-anti- σ , de nature encore inconnue, pourrait aboutir au phénotype Pig-pap. Par ailleurs, l'analyse de dix mutants issus de papilles du transconjugant pap3(*whiG*) a montré que le transgène *whiG* constitue une cible mutationnelle affectée à haute fréquence pendant la différenciation du mycélium aérien.

La mutabilité qui correspond à la production de mutants Pig-pap au sein d'une colonie de *Streptomyces* est augmentée lors d'une carence en acides aminés. En effet, lorsque *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont cultivées sur un milieu carencé en acides aminés, le nombre de mutants Pig-pap générés par une colonie augmente de façon drastique, alors que lorsque le milieu est très riche en acides aminés, il diminue très fortement. Un mutant *relA* de *S. coelicolor*, mutant qui ne synthétise plus de ppGpp, ne produit pas ou très peu de tels mutants. La réponse stringente est donc impliquée dans la production de mutants Pig-pap au sein de la colonie.