



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>



Faculté des Sciences - UFR Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale : Biologie, Santé, Environnement

**Impact de la réponse stringente sur la mutabilité de
Streptomyces coelicolor et *Streptomyces ambofaciens*
au cours de la différenciation**

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en Génétique Moléculaire

par **Magali GENAY**

Soutenance publique le 14 novembre 2006 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :

Marie-Joëlle VIROLLE CR1 CNRS (HDR), Université d'Orsay

Michel FONS Professeur, Université Aix-Marseille III

Examineurs :

Philippe MAZODIER Directeur de recherche (HDR), Institut Pasteur, Paris

Bernard DECARIS Professeur, Université Nancy 1

Annie DARY Professeur, Université Nancy 1.

REMERCIEMENTS

Merci Monsieur le Professeur Bernard Decaris de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, de m'avoir fait confiance et de m'avoir, au travers de nombreuses discussions, inculqué réflexion et rigueur scientifiques, deux valeurs auxquelles je me rattacherai dans ma vie future.

Merci Annie, pour ta confiance, ta bonne humeur, ton soutien, ton encadrement minutieux, ta gentillesse, ta disponibilité, ta joie de vivre, ta compétence, ta pédagogie, ta volonté (la liste est longue... mais je vais m'arrêter là). Tu es la « chef » idéale.

Merci Madame le Docteur Marie-Joëlle Virolle et Monsieur le Professeur Michel Fons d'avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que Monsieur le Docteur Philippe Mazodier d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Merci à tous mes amis, du laboratoire pour les moments de détente à midi et certains soirs (Sibel, Kévin, Chroune, Miki, Nico, Guigui, Alex, Axelle, Jérôme, Arran, Emilie, Céline, Philippe, Chloé), du DESS NIP pour les agréables vacances et week-ends passés ensemble (Karine, Séb, Sylvia, Nico Bru, Nico Bux, Laeti) et à mes amis de Lachambre pour toutes les fêtes et mariages qu'on a célébrés (Rachel, Annette, Perrin, Buz, Pet, Hervé, Sophie, MJ, Dom, Gautier, Sophie). Vous m'avez offert des moments de détente et de franches rigolades à des périodes un peu difficiles dans ma thèse.

Merci à toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai partagé mes joies, mes angoisses, et qui ont toujours su m'écouter et me soutenir (la liste serait trop longue, ils se reconnaîtront !). Un merci particulier à Céline, qui a compris plus que quiconque mes angoisses, ainsi qu'à Alex. Vous n'avez jamais refusé de me tendre un bras et une oreille pour me consoler. Je rends également hommage à la patience de mes collègues de bureau (Virginie, Miki, Alex et Arran) lorsque mon humeur n'était pas au beau fixe.

Un merci tout particulier à Sibel, qui plus qu'une collègue de travail, est devenue une véritable amie. J'espère que nous resterons toujours très proches.

Merci à ma petite sœur Fanny et à mes parents, sans qui je n'aurais pu arriver jusque là aujourd'hui. Tous ces week-ends dans un cadre familial (choucroute, couscous, devoir de math) m'ont permis de me détendre après de dures semaines de labeur.

Enfin, merci Jean-Yves, d'avoir supporté mes humeurs changeantes tout au long de ces années de thèse tout en gardant ta bonne humeur. Ca n'a pas dû être facile tous les jours ! Tu m'as transmis ta joie de vivre à chaque instant, et m'as permis de surmonter les moments difficiles. Je t'aime !

Sommaire

Introduction.....	1
1 Mécanismes permettant le maintien de l'intégrité de l'information génétique	2
1.1 L'utilisation de polymérases « error-free » : fidélité de la réplication	2
1.1.1 La polymérase polIII.....	2
1.1.1.1 Chez <i>E. coli</i>	2
1.1.1.2 Chez les Gram positives	5
1.1.2 La polymérase polII	5
1.1.2.1 Chez <i>E. coli</i>	6
1.1.2.2 Chez <i>Streptomyces coelicolor</i>	7
1.1.3 Conclusion	7
1.2 La réparation post-réplivative	8
1.2.1 Présentation de ces systèmes chez <i>E. coli</i> et <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
1.2.1.1 Contrôle du taux de mutation par reconnaissance du brin néosynthétisé	8
1.2.1.2 Contrôle du taux de mutation par inhibition de la recombinaison homéologue	10
1.2.2 Distribution de ces systèmes de réparation	11
1.2.3 Conclusion	11
1.3 Les protéines de réparation des lésions hors processus de réplication	11
1.3.1 Réparation des modifications de bases	11
1.3.2 Réparation des lésions causées par les espèces oxygène réactives (ROS).....	13
2 Facteurs endogènes augmentant la mutabilité.....	15
2.1 Notion de gènes mutateurs.....	15
2.1.1 Définition	15
2.1.2 Mutation dans les gènes des systèmes de maintien de l'information génétique	15
2.1.2.1 Mutation ou variation d'expression des gènes du système MMR	15
2.1.2.2 Mutation dans les gènes codant les sous-unités de polymérases : exemple de <i>dnaE</i> , <i>dnaQ</i> , <i>dnaX</i> et <i>polA</i>	17
2.1.2.3 Mutation dans les gènes intervenant dans la recombinaison : exemples de <i>recG</i> et <i>recA</i>	20
2.1.2.4 Mutation dans les gènes <i>mutM</i> , <i>mutY</i> ou <i>mutT</i>	21
2.2 La transcription, source de mutation	21
2.3 Le système SOS.....	22
2.3.1 Induction en phase stationnaire.....	22
2.3.2 Induction par reconnaissance d'ADN étranger	24
3 Facteurs environnementaux augmentant la mutabilité	24
3.1 Intervention des facteurs σ -alternatifs	25
3.2 RpoS, facteur général de la réponse au stress	25
3.2.1 Mode d'action de σ^S et régulon <i>rpoS</i>	25
3.2.2 Rôle de σ^S dans l'augmentation du taux de mutation	29
3.2.2.1 Activation de polymérases « error-prone »	29
3.2.2.2 Inhibition du système MMR.....	29
3.3 Concept de mutations « adaptatives »	30
3.3.1 L'exemple de <i>lac</i> ⁻ de FC40. Modèles d'hypermutabilité/amplification	31
3.3.2 Mutant « GASP » <i>rpoS</i>	31
3.3.3 Mutant « GASP » <i>lrp</i>	32
3.3.4 Mutant « GASP » <i>sgaA</i>	33
3.4 Un exemple de réponse au stress : la réponse stringente	35
3.4.1 Présentation générale de la réponse stringente	35
3.4.2 Action du (p)ppGpp sur l'expression génique	36
3.4.3 Action du (p)ppGpp sur la compétitivité des facteurs σ	37
3.4.4 Réponse stringente et évolution	38
3.4.5 Réponse stringente et réplication	39
3.4.6 La réponse stringente comme stratégie de survie	39
4 <i>Streptomyces</i> : un modèle d'étude de l'instabilité génétique	42
4.1 Différenciation morphologique et physiologique des <i>Streptomyces</i>	42
4.1.1 Cycle de différenciation.....	42

4.1.2	Différenciation physiologique.....	43
4.2	Identification de mutants bloqués dans la différenciation morphologique	44
4.2.1	Les mutants <i>bld</i>	44
4.2.2	Les mutants <i>whi</i>	45
4.2.2.1	Présentation générale des gènes <i>whi</i>	45
4.2.2.2	Le gène <i>whiG</i>	47
4.2.2.3	Le gène <i>whiH</i>	48
4.2.2.4	Le gène <i>whiI</i>	49
4.2.2.5	Le gène <i>whiA</i>	49
4.2.2.6	Le gène <i>whiB</i>	50
4.2.2.7	Le gène <i>whiE</i>	50
4.2.2.8	Le gène <i>sigF</i>	51
4.2.2.9	Le gène <i>whiD</i>	51
4.3	<i>Streptomyces</i> est caractérisé par une forte instabilité génétique.....	52
4.4	Présentation des mutants Pig`pap.....	55
4.4.1	Caractéristiques des mutants Pig`pap	55
4.4.2	Action de facteurs génétiques et environnementaux sur la production de papilles	56
4.5	Problématique abordée	56
	Résultats.....	59
1	Influence d'une limitation en nutriments sur la production de papilles chez <i>S. ambofaciens</i> et <i>coelicolor</i>	59
1.1	Détermination du composant responsable de la modulation de la production de papilles ..	59
1.2	Détermination de l'élément nutritif responsable de la modulation de la production de papilles	65
1.2.1	Influence du sodium sur la production de papilles.....	67
1.2.2	Influence du soufre sur la production de papilles	67
1.2.3	Influence des acides aminés sur la production de papilles.....	68
2	Caractérisation de mutants Pig`pap de <i>S. ambofaciens</i> et <i>S. coelicolor</i> issus de différents contextes nutritionnels	73
2.1	Caractérisation de mutants Pig`pap de <i>S. ambofaciens</i> issus de contextes nutritionnels différents	73
2.1.1	Le phénotype des mutants Pig`pap « HTC » est héritable et stable	75
2.1.2	Les mutants Pig`pap « HTC » ne produisent pas de spores	75
2.1.3	Les mutants Pig`pap « HTC » ne présentent pas de grand réarrangement génomique.....	75
2.1.4	Les mutants Pig`pap « HTC » sont complémentables par le gène <i>whiG</i>	76
2.1.5	Caractérisation de papilles issues de transconjugants gris	78
2.1.6	Estimation de la stabilité des plasmides pSET152 et pSET152(<i>whiG</i>)	81
2.1.7	Les mutants Pig`pap « HTC » présentent une mutation du gène <i>whiG</i>	82
2.1.8	Caractérisation moléculaire de mutants Pig`pap <i>S. ambofaciens</i> grâce à l'utilisation de la technique de SSCP	85
2.2	Caractérisation de mutants Pig`pap de <i>S. coelicolor</i> issus de contextes nutritionnels différents	92
2.2.1	Caractérisation moléculaire de mutants Pig`pap <i>S. coelicolor</i> grâce à l'utilisation de la technique de SSCP	93
2.2.2	Séquençage du gène <i>whiG</i> des mutants Pig`pap de <i>S. coelicolor</i>	93
2.2.3	Analyse transcriptionnelle du gène <i>whiH</i> chez les mutants Pig`pap de <i>S. coelicolor</i> ..	94
2.2.4	Complémentation du phénotype Pig`pap chez <i>S. coelicolor</i>	95
2.2.5	Séquençage des gènes <i>whiG</i> et <i>whiH</i> chez les mutants Pig`pap de <i>S. coelicolor</i>	97
3	La réponse stringente est impliquée dans la production de mutants Pig`pap	104
3.1	Le mutant <i>relA</i> M570 ne produit pas de papilles	104
3.2	Complémentation du mutant <i>relA</i> M570	105
3.3	Caractérisation de mutants Pig`pap issus de complémentants	110
3.4	Séquençage du gène <i>relA</i> chez <i>S. ambofaciens</i>	113
4	Publications	116
5	Communications orales	159

Discussion.....	163
1 Les mutants Pig ⁻ pap, un nouvel outil pour étudier la stabilité des génomes	164
2 Les mutants Pig ⁻ pap sont fortement produits lors d'une limitation en acides aminés.....	167
2.1 Une limitation en acides aminés augmente la mutabilité	167
2.2 Rôle des acides aminés dans une cellule	168
2.3 Autres types de carences nutritives augmentant la mutabilité.....	168
2.4 Rôle des papilles : une diversification de la population ?.....	169
2.5 Type de mutabilité engendrée par une limitation en acides aminés	170
3 Les mutants Pig ⁻ pap de <i>S. ambofaciens</i> et <i>S. coelicolor</i> sont mutés dans les gènes <i>whiG</i> ou <i>whiH</i>	171
3.1 Les mutants Pig ⁻ pap de <i>S. ambofaciens</i>	171
3.2 Les mutants Pig ⁻ pap de <i>S. coelicolor</i>	172
3.3 Influence du milieu de culture sur la nature des mutants Pig ⁻ pap.....	173
3.4 Etude de la nature des mutations	174
3.4.1 Spectre de mutations de type frameshift et substitution.....	174
3.4.2 Mutation perte de fonction.....	176
3.5 Hypothèses sur la différence de spectre de mutation observée entre <i>S. ambofaciens</i> et <i>S. coelicolor</i>	177
4 Relation entre réponse stringente et production de papilles	180
4.1 Le mutant <i>relA</i> ne produit plus de papilles.....	180
4.2 Mise en place d'un état mutateur.....	180
4.2.1 Avantage de l'état mutateur dans l'adaptation.....	180
4.2.2 Etat mutateur global.....	181
4.2.3 Etat mutateur local	181
4.2.4 Réponse stringente et mise en place d'un état mutateur	183
4.2.4.1 Etat mutateur transitoire	183
4.2.4.2 Etat mutateur héréditaire	183
4.2.5 Conclusion	184
4.3 Par quels mécanismes la réponse stringente peut-elle être à l'origine des papilles ?	185
4.3.1 Modification directe du taux d'expression de certains gènes	185
4.3.2 Modification d'expression par induction de facteurs σ -alternatifs	187
4.3.3 Modification d'expression par augmentation de la compétitivité des facteurs σ - alternatifs	188
4.4 Comparaison moléculaire et physiologique de la réponse stringente chez différents <i>Streptomyces</i>	189
4.5 Réponse stringente et héritabilité du phénotype mutateur : un modèle épigénétique ?.....	192
Références bibliographiques.....	197

Introduction

Dans la nature, les organismes sont constamment soumis à des variations de l'environnement, de différentes natures : chimique, physique ou nutritionnelle. De plus, le développement de chaque espèce est fonction de la pression exercée par les autres communautés bactériennes au sein d'une même niche écologique. En effet, l'étude de la quantité de micro-organismes vivant dans un même écosystème a révélé qu'une très large diversité et une très forte concentration d'individus y étaient présentes. Par exemple, le nombre de micro-organismes vivant dans l'eau de mer a été estimé à 10^4 - 10^7 cellules par millilitre d'eau et le nombre de ceux vivant dans le sol à 10^7 cellules par gramme de sol (Whitman *et al.*, 1998). Ainsi, de telles conditions environnementales impliquent que les micro-organismes sont soumis à de nombreuses pressions de sélection et que seuls les individus les mieux adaptés survivront. La croissance exponentielle telle qu'elle est observée en culture pure et en conditions de laboratoire apparaît donc marginale dans la vie d'une bactérie.

Les mécanismes d'adaptation peuvent être classés en deux grandes catégories (Massey and Buckling, 2002). La première implique une régulation différentielle des gènes, qui va entraîner une modification du métabolisme de la bactérie en réponse à une situation défavorable à sa croissance. Une telle régulation implique que les ancêtres de la bactérie aient déjà été confrontés à ce type de situation défavorable et que des mécanismes de régulation du métabolisme adaptés aient été sélectionnés. La modification du taux de mutation du génome peut également aboutir à une adaptation. Les bactéries peuvent passer par un état qualifié de mutateur, état durant lequel le taux de mutation est fortement augmenté. Cet état va générer des génotypes et des phénotypes alternatifs et ainsi favoriser l'émergence d'un polymorphisme génétique au sein d'une population bactérienne (Arjan *et al.*, 1999). Cet état, en augmentant la fréquence de mutation, augmente ainsi la probabilité d'adaptation par sélection d'une mutation favorable, c'est-à-dire d'une mutation qui va conférer un avantage adaptatif, dans une situation donnée, au variant génotypique qui la porte. Par exemple, il a été montré que chez *Escherichia coli*, des souches mutatrices étaient plus compétitives qu'une souche sauvage pour coloniser un nouvel environnement tel qu'un intestin de jeune souris (Giraud *et al.*, 2001). Un phénotype mutateur peut donc être favorisé lors de la colonisation de nouveaux environnements. Cependant, malgré l'avantage adaptatif apporté par une augmentation du taux de mutation, la mise en place d'un état mutateur ne peut être que transitoire, du fait de l'augmentation du taux de mutations défavorables et donc d'un fardeau génétique très élevé pour la population bactérienne. Ainsi, de nombreux auteurs s'accordent à dire que dans des conditions permettant une croissance exponentielle, les mécanismes de contrôle de l'information génétique tendent à maintenir un taux de mutation le plus faible possible (Drake, 1991; Taddei *et al.*, 1997a; Taddei *et al.*, 1997b). Il existe ainsi une balance au sein d'une population entre maintenir un fardeau génétique faible et donc un taux de mutation faible et présenter une probabilité forte d'émergence

d'une mutation adaptative résultant d'un taux de mutation élevé (Radman *et al.*, 2000).

De nombreux facteurs peuvent entraîner une variation du taux de mutation. Ces facteurs peuvent être génétiques, par exemple lorsqu'un gène intervenant dans les fonctions de réparation de l'ADN est muté, ou environnementaux.

Au travers de l'étude d'un organisme bactérien complexe, *Streptomyces*, notre objectif a consisté à tenter de mettre en évidence l'influence de facteurs environnementaux, ainsi que des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués, sur le taux de mutation et donc sur l'adaptation à des conditions défavorables de croissance. Ainsi, cette introduction sera axée sur les mécanismes influençant l'intégrité de la séquence nucléotidique. Dans une première partie seront présentés les systèmes contrôlant l'intégrité de la séquence d'ADN. Ces systèmes sont principalement actifs en phase exponentielle de croissance. Par contre, les facteurs génétiques et environnementaux présentés dans les parties 2 et 3 de cette introduction vont tendre à modifier la mutabilité du génome, cette modulation du taux de mutation pouvant avoir de nombreuses conséquences, notamment en termes d'adaptation et de survie des populations bactériennes.

1 Mécanismes permettant le maintien de l'intégrité de l'information génétique

1.1 L'utilisation de polymérases « error-free » : fidélité de la réplication

Selon leur fidélité vis-à-vis de la réplication de l'ADN, 2 types de polymérases sont distingués dans le monde bactérien : les polymérases « error-free » et les polymérases « error-prone ». L'étude de mutants pour ces différentes polymérases a montré qu'en conditions optimales de croissance, ce sont les polymérases « error-free » qui sont préférentiellement utilisées, notamment la polymérase III (Kornberg and Baker, 1992).

1.1.1 La polymérase polIII

1.1.1.1 *Chez E. coli*

C'est la polymérase utilisée pour la réplication du chromosome d'*E. coli* (Kelman and

O'Donnell, 1995). Elle est constituée d'au moins 10 polypeptides différents (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des sous-unités formant le complexe polymérasique III d'*E. coli*. Les gènes codant chacune des sous-unités et les fonctions associées sont indiqués.

Sous-unité	Gène	Rôle
α	<i>dnaE</i>	Polymérase 5'-3'
ϵ	<i>dnaQ</i>	Exonucléase 3'-5'
θ	<i>holE</i>	Stabilise ϵ
τ	<i>dnaX</i>	ATPase
γ	<i>dnaX</i>	ATPase
δ	<i>holA</i>	Interaction avec β
δ'	<i>holB</i>	Stimule γ
χ	<i>holC</i>	Interaction avec SSB
ψ	<i>holD</i>	Liaison à χ
β_2	<i>dnaN</i>	Facteur de processivité (sous forme homodimérique)

L'holoenzyme est formée de 2 molécules « core » constituées des sous-unités α , ϵ et θ , ces 2 molécules étant reliées par un dimère de la sous-unité τ (Figure 1). Chaque « core » de l'holoenzyme contient un facteur homodimérique β_2 permettant la liaison à l'ADN et ainsi une forte processivité. Le complexe DnaX, formé des sous-unités γ , δ , δ' , χ , ψ et du dimère τ , permet l'interaction avec des molécules essentielles comme l'ATP, l'hélicase DnaB ou les protéines SSB. La sous-unité δ permet également le détachement ou le rattachement du complexe polymérasique en interagissant avec le facteur β_2 , influençant par conséquent la processivité (Johnson and O'Donnell, 2005; McHenry, 2003).

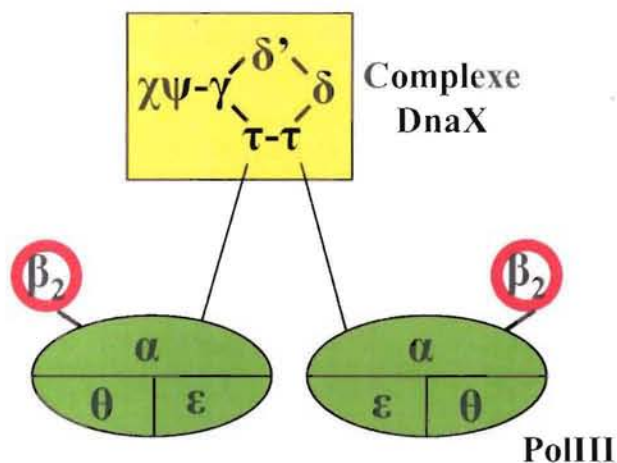


Figure 1 : Modèle structural montrant les sous-unités composant l'holoenzyme PolIII et les principaux contacts protéine-protéine. Les sous-unités dans le rectangle jaune sont celles qui composent le complexe DnaX. Les ovales verts représentent les « core-enzymes ». L'anneau rouge représente le facteur de processivité β_2 lié à α , mais qui peut également interagir avec δ (d'après Mc Henry, 2003).

La haute fidélité de la réplication des polymérases « error-free » s'explique par le fait qu'elles commettent très peu d'erreurs d'incorporation des bases et qu'elles sont capables de relecture. Chez la polymérase polIII, ces activités dépendent des sous-unités α et ϵ . La sous-unité α possède l'activité polymérase 5'-3' et permet l'incorporation des nucléotides corrects alors que la sous-unité ϵ possède l'activité exonucléase 3'-5' et permet donc l'excision des nucléotides mal appariés (Lehtinen and Perrino, 2004). Le rôle de la sous-unité θ est encore peu connu (Studwell-Vaughan and O'Donnell, 1993). Slater *et al.* (1994) ont montré que le taux de mutants spontanés résistants à la rifampicine et à l'acide nalidixique d'une souche délétée du gène *holE* n'était pas différent de celui d'une souche sauvage, suggérant d'une part que cette sous-unité n'est pas essentielle puisqu'un mutant délété du gène *holE* est viable et d'autre part que le taux de mutation est peu ou pas affecté chez un tel mutant. Cependant, des travaux récents ont montré que la sous-unité θ pourrait quand même jouer un rôle dans la fidélité de la réplication en stabilisant la sous-unité ϵ , qui serait beaucoup plus instable en absence de θ (Taft-Benz and Schaaper, 2004). Contrairement aux expériences de Slater *et al.*, ces études ont été réalisées chez une souche *mutL*⁻ déficiente dans la réparation post-réplivative, ce qui a permis d'observer de façon plus directe les erreurs lors du processus de réplication. Il a ainsi été montré que chez cette souche *mutL*⁻ Δ *holE* le taux de substitutions et de mutations frameshift était augmenté d'un facteur 2 à 4 par rapport à une souche *mutL*⁻ *holE*⁺.

1.1.1.2 Chez les Gram positives

Il a été détecté dans la plupart des bactéries à coloration Gram positive, telles que *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycobacterium* ou *Streptomyces coelicolor*, 2 copies de gènes très homologues à ceux codant la sous-unité α de la polymérase polIII d'*E. coli* : il s'agit des gènes *dnaE* et *polC* (Bruck *et al.*, 2003; Dervyn *et al.*, 2001; Flett *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2001). La protéine DnaE est l'homologue de la sous-unité α des bactéries à coloration Gram négative alors que la protéine PolC est spécifique des bactéries à coloration Gram positive. Les auteurs proposent qu'un événement de duplication du gène *polC* se serait produit avant la divergence entre bactéries à coloration Gram positive et bactéries à coloration Gram négative et que l'une des 2 copies ait ensuite été perdue dans la lignée des bactéries à coloration Gram négative (Koonin and Bork, 1996). Il a été montré que ces copies sont toutes les deux indispensables à la viabilité chez de nombreuses espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, les *Bacillus* et les *Clostridium* ou *Thermotoga maritima* et qu'elles interviennent dans la réplication. Par exemple, l'étude de mutants à réplication thermosensible de *Staphylococcus aureus* a montré que la viabilité était réduite chez le simple mutant *polC* et chez le simple mutant *dnaE* à température non permissive (Inoue *et al.*, 2001). Dervyn *et al* (2001) ont tenté d'inactiver le gène *dnaE* de *B. subtilis* en utilisant un plasmide insertionnel, le caractère essentiel du gène *polC* ayant déjà été démontré. Ils n'ont jamais obtenu de mutants alors que cette technique d'inactivation fonctionnait pour d'autres gènes, suggérant que l'inactivation du gène *dnaE* était létale. Il a été proposé que chaque copie de ce gène réplique un des brins d'ADN. Cependant, alors que PolC possède les 2 activités polymérase 5'-3' et exonucléase 3'-5', DnaE ne présente pas cette dernière activité et semble ne pas se complexer à une sous-unité de genre ϵ , comme c'est le cas chez *E. coli* (Bruck *et al.*, 2003). De ce fait, elle serait plutôt classée dans les polymérases « error-prone » et constituerait le premier exemple de polymérase « error-prone » indispensable à la viabilité.

1.1.2 La polymérase polII

Polymérase la plus conservée dans le monde bactérien, elle est présente dans des espèces vivant dans des environnements très différents et appartenant à des groupes très éloignés phylogénétiquement (*Deinococcus radiodurans* (résistante à la radioactivité), *Thermus aquaticus*

(isolée des sources d'eau chaude), *E. coli* (bactérie intestinale) ou *Chlamydia trachomatis* (parasite intracellulaire obligatoire)). Il est ainsi possible de compléter l'effet létal de la délétion dans un organisme de l'activité de polI en introduisant la protéine polI d'un autre organisme. Ceci suggère une très forte conservation de la fonction de la polymérase polI chez nombre de procaryotes, en dépit d'une relativement faible conservation de sa séquence protéique. En effet, seuls 3 motifs seraient très conservés et très peu d'acides aminés (moins de 10) auraient réellement un rôle dans la liaison et l'incorporation des nucléotides (Patel *et al.*, 2001). Ces motifs et nucléotides sont importants pour la structuration tridimensionnelle de la protéine et donc pour sa fonctionnalité. Ainsi, la superposition des structures tridimensionnelles de différentes polymérases polI d'espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées (*T. aquaticus*, *E. coli*, *Bacillus* et bactériophage T7) révèle une structuration, notamment au niveau des hélices- α et des feuillets- β , quasi-identique.

1.1.2.1 Chez *E. coli*

Chez *E. coli*, organisme bactérien le mieux étudié, c'est la polymérase la plus abondante dans les cellules. Protéine d'environ 1000 acides aminés, elle possède 3 fonctions enzymatiques : une activité polymérase 5'-3', une activité exonucléase 3'-5' (ces 2 activités forment le domaine Klenow) et une activité exonucléase 5'-3' (Nagata *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2001). Contrairement à la polymérase polIII, la polymérase polI d'*E. coli* jouerait plus un rôle dans la réparation que dans la réplication, dans laquelle elle n'intervient que pour combler les interstices lors de la maturation des fragments d'Okasaki (Olivera and Bonhoeffer, 1974). Elle est notamment capable d'exciser les lésions de type dimères de thymine, 8-oxo-guanine et 4-méthyl-adénine (Patel *et al.*, 2001).

Ce rôle dans le maintien de l'intégrité du génome ne se cantonne pas à cette activité de réparation. En effet, récemment, un rôle supplémentaire a été attribué à la polymérase polI. L'analyse d'un mutant d'*E. coli* déficient pour cette enzyme a montré que la polymérase polI intervenait dans la terminaison de la réplication du chromosome circulaire d'*E. coli*, comme le fait la protéine Tus. La protéine Tus détermine la région de terminaison de la réplication par la polymérase polIII en agissant avec les sites « ter ». Ces sites sont polarisés et la fourche de réplication est bloquée avec une orientation spécifique par interaction de la protéine Tus avec l'hélicase DnaB. Chez le mutant *polA* d'*E. coli*, comme chez le mutant déficient pour la protéine Tus, une surproduction d'ADN est observée, suggérant un dysfonctionnement des fonctions de terminaison de la réplication (Markovitz, 2005). Ce rôle dans la terminaison de la réplication permet d'éviter les réarrangements génomiques qui se déroulent lorsque la réplication ne peut être achevée et permet donc le maintien de l'information génétique.

1.1.2.2 Chez *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces, organisme sur lequel notre étude s'est portée, appartient au groupe des bactéries à coloration Gram positive à haut pourcentage en bases GC et présente un chromosome linéaire. Au centre de ce chromosome se situe une origine de réplication qui fonctionne de manière bidirectionnelle et définit 2 bras chromosomiques. La linéarité du chromosome nécessite l'intervention d'un complexe télomérique, contenant les protéines Tpg et Tap, pour répliquer les extrémités du chromosome. L'étude du complexe télomérique de *S. coelicolor* a permis de mettre en évidence un rôle supplémentaire de la polymérase polII chez cette espèce, en plus des activités de réparation et de réplication. Des analyses de ce complexe ont montré qu'il contenait également la polymérase polI (PolA) et la topoisomérase I (TopA) et que ces 2 enzymes présentaient une activité transcriptase inverse permettant la réplication terminale du chromosome (Bao and Cohen, 2004). Le chromosome des *Streptomyces* est sujet à de fréquents réarrangements au niveau de ses extrémités, réarrangements pouvant mener à la circularisation du chromosome. Or, il a été montré que dans le cas de la réplication d'un chromosome circulaire, les protéines Tpg et Tap sont dispensables, alors les protéines PolA et TopA ne le sont pas, montrant leur rôle essentiel dans la terminaison de la réplication d'un chromosome de structure linéaire ou circulaire.

1.1.3 Conclusion

Ainsi, le maintien de l'intégrité de la séquence nucléotidique au cours du processus de réplication est facilité par l'intervention d'une seule enzyme possédant 2 fonctions enzymatiques complémentaires : l'activité polymérase 5'-3', permettant l'incorporation correcte des nucléotides pendant la réplication, et l'activité exonucléase, permettant l'excision d'un nucléotide s'il a été mal incorporé. A l'issue du processus de réplication, le taux de mutation engendré est faible, de l'ordre de 10^{-8} par paire de bases appariées.

1.2 La réparation post-réplivative

1.2.1 Présentation de ces systèmes chez *E. coli* et *Streptococcus pneumoniae*

S'il reste des erreurs après le processus de réplication, un système de réparation post-réplivative des mésappariements se met en place. Chez *E. coli*, il s'agit du système MMR (pour Methyl-directed Mismatch Repair). Ce système fait intervenir 4 protéines essentielles : la protéine Dam, qui méthyle l'ADN au niveau des adénosines des séquences GATC, la protéine MutS, qui reconnaît et se lie au mésappariement, la protéine MutL, qui grâce à de l'ATP et à MutS activerait MutH, endonucléase qui clive le brin d'ADN au niveau du mésappariement (Figure 2). MutH recruterait également l'hélicase UvrD et une exonucléase qui dégrade le brin sur lequel se situe le mésappariement. Enfin, la polymérase polIII resynthétise le brin dégradé, aidée des protéines SSB et DNA ligase.

Chez *Streptococcus pneumoniae*, un système très homologue au système MMR d'*E. coli* a été identifié. Il s'agit du système Hex. Les 2 principales protéines intervenant dans ce système sont les protéines HexA et HexB. HexA est très homologue à la protéine MutS d'*E. coli* et de *Salmonella typhimurium*, suggérant qu'elles dériveraient d'un ancêtre commun aux Streptocoques (Gram positive) et aux entérobactéries (Gram négative) (Haber *et al.*, 1988; Priebe *et al.*, 1988). De même, HexB est très homologue à la protéine MutL d'*E. coli* et de *S. typhimurium* et à la protéine PMS1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Prudhomme *et al.*, 1989).

1.2.1.1 *Contrôle du taux de mutation par reconnaissance du brin néosynthétisé*

Le système MMR joue un rôle essentiel dans la réparation post-réplivative, grâce à sa capacité de reconnaissance du brin néosynthétisé. En effet, un système incapable de discriminer les 2 brins mais capable de localiser un mésappariement, va réparer l'un ou l'autre brin de façon aléatoire. Ainsi, statistiquement, dans 50 % des cas, une mutation va être fixée, si la correction se fait sur le brin parental. Chez *E. coli*, l'intervention de la protéine Dam permet au système MMR de réduire fortement le taux de mutation. Lors de la réplication, le brin néosynthétisé n'est pas méthylé directement et il existe un laps de temps durant lequel l'hétéroduplex est sous forme hémiméthylée. C'est grâce à cette hémiméthylation que les protéines MutHLS vont pouvoir discriminer le brin fils

et réparer en préservant la séquence du brin parental. Une fois la réparation achevée, la protéine Dam méthyle le brin néosynthétisé, le rendant réfractaire à de futures actions du système MMR (Figure 2).

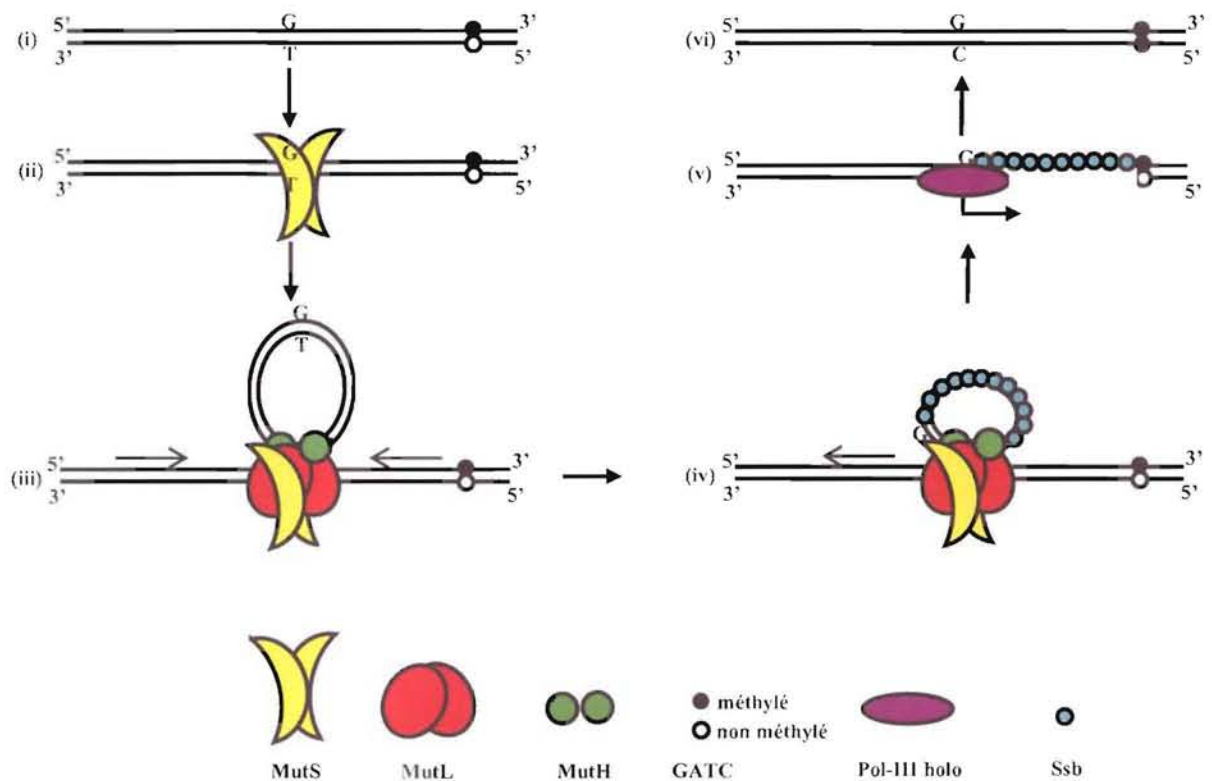


Figure 2 : Modèle représentant le fonctionnement du système MMR chez *E. coli*. (i) Mésappariement entre une guanosine (G) et une thymidine (T). (ii) Liaison de MutS sous forme d'homodimère. (iii) Assemblage du complexe multiprotéique contenant MutS, MutL et MutH, mouvement de l'ADN dans le sens des flèches grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP et clivage du brin non méthylé par MutH. (iv) Le brin clivé est dégradé par une exonuclease, l'autre brin étant protégé par des protéines Ssb. (v) La polymérase III (Pol-III holo) resynthétise le brin dégradé et la DNA ligase lie les extrémités. (vi) Le processus s'achève par la méthylation du brin néosynthétisé (d'après Jiricny, 1998).

Malgré la grande homologie entre le système Hex et le système MMR, le mode de discrimination du brin à réparer n'est pas le même. Le système Hex n'est pas dirigé par la méthylation, mais par la reconnaissance de cassures simple brin dans l'ADN. Le système Hex reconnaît un mésappariement et, afin de déterminer quel est le brin à réparer, il recherche la présence d'une extrémité simple brin qui identifierait le brin naissant lors de la réplication ou l'ADN donneur lors d'une transformation (Prudhomme *et al.*, 1989). Le système Hex est moins efficace que le système MMR car il recherche sur la totalité du brin naissant ou du brin donneur la présence de cassure simple brin afin de les discriminer puis de corriger le brin correct, alors que

256 pb en moyenne sont suffisants au système MMR d'*E. coli* pour détecter une méthylation ou une absence de méthylation et discriminer le brin d'ADN à réparer (Majewski *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Contrôle du taux de mutation par inhibition de la recombinaison homéologue

Chez *E. coli*, en plus de sa fonction de réparation post-réplivative, le système MMR constitue une barrière à la recombinaison homéologue, notamment en inhibant RecA, protéine nécessaire aux événements de recombinaison (Calmann *et al.*, 2005a; Calmann *et al.*, 2005b; Schofield and Hsieh, 2003). Ceci permet non seulement de préserver l'architecture du génome en inhibant les grands réarrangements chromosomiques tels que translocations ou délétions, dus à des événements de recombinaison entre des régions du génome présentant un degré relativement fort d'homologie, mais également les remplacements de gènes lors d'événements de transfert horizontal. Ainsi, le système MMR inhibe d'un facteur 1000 la recombinaison entre des fragments d'ADN de *S. typhimurium* et *E. coli*, espèces dont l'ancêtre commun est estimé à 150 millions d'années et présentant 80 % d'homologie, lors d'expériences de conjugaison. Il permet ainsi de maintenir une barrière génétique entre espèces qui ont récemment divergé et constitue un frein aux événements de transfert horizontal. Le système MMR contribue ainsi non seulement au maintien de l'intégrité de l'information génétique d'une espèce mais participe également à la spéciation (Rayssiguier *et al.*, 1989).

Le système Hex joue également un rôle de barrière génétique en interférant avec la recombinaison. Son efficacité est plus faible que le système MMR d'*E. coli* mais plus importante que celui de *B. subtilis*, qui n'a qu'un rôle marginal dans la prévention de la recombinaison homéologue. Ce rôle minime peut être expliqué par le fait que *B. subtilis* n'est compétent, donc susceptible d'acquérir de l'ADN étranger, que lors d'une limitation en nutriments et que dans ces conditions, les protéines du système MMR sont dégradées. Chez *S. pneumoniae*, la compétence ne nécessite pas une carence nutritive et les protéines du système Hex ne sont donc pas dégradées et restent aptes à prévenir la recombinaison homéologue (Majewski *et al.*, 2000). Enfin, la moins bonne efficacité du système Hex par rapport au système MMR d'*E. coli* pourrait s'expliquer par le fait qu'il sature beaucoup plus rapidement que le système MMR. Ainsi, plus l'identité est faible entre ADN donneur et ADN receveur, plus le système Hex devient rapidement saturé et plus le nombre d'événements de recombinaison homéologue est important (Humbert *et al.*, 1995).

1.2.2 Distribution de ces systèmes de réparation

Les protéines de ce type de système de réparation post-répllicative sont très conservées dans le monde du vivant. Elles sont présentes autant chez les bactéries, comme *T. aquaticus* ou *E. coli*, que chez les mammifères comme la souris ou l'homme, les levures, comme *Schizosaccharomyces pombe*, les invertébrés, comme *Caenorhabditis elegans*, les insectes, comme *Drosophila melanogaster* ou encore les plantes, telles que *Arabidopsis thaliana* (Harfe and Jinks-Robertson, 2000). Un homologue à la protéine MutS a également été détecté dans les 3 archéobactéries dont le génome a entièrement été séquencé (Eisen, 1998). Chez la levure *S. cerevisiae*, par exemple, 6 homologues à *mutS* et 4 à *mutL* ont été identifiés. Contrairement aux procaryotes, les homologues aux protéines MutH, MutL et MutS des eucaryotes agiraient sous forme d'hétérodimères et non sous forme d'homodimères. Cette forte conservation au travers d'organismes si variés montre le rôle prépondérant du système de réparation post-répllicative dans la réparation de l'ADN (Hsieh, 2001).

1.2.3 Conclusion

Ainsi, le taux de mutation spontanée dans l'ADN est inférieur à 10^{-8} voire 10^{-10} par paire de bases répliquée, ceci grâce à l'intervention de 3 mécanismes : la discrimination des nucléotides corrects et incorrects par l'ADN polymérase avant leur incorporation, l'excision des nucléotides incorrects nouvellement incorporés grâce à l'activité exonucléase de la polymérase, la reconnaissance et la réparation des mésappariements résiduels par le système MMR (Tago *et al.*, 2005). Le taux de mutation observé reflète donc l'équilibre entre le nombre d'erreurs et le nombre de celles qui ont été corrigées, ou mal corrigées.

1.3 Les protéines de réparation des lésions hors processus de réplication

1.3.1 Réparation des modifications de bases

La forte réactivité chimique des bases de l'ADN fait qu'elles sont sujettes à de fréquentes modifications, telles que des alkylations, des oxydations ou des désaminations. La formation de sites abasiques est également un événement qui peut affecter la séquence protéique. Des gènes

codant des protéines permettant la réparation des modifications de l'information génétique qui se déroulent en dehors de tout processus de réplication ont été sélectionnés.

Chez *E. coli*, plusieurs enzymes interviennent dans la réparation des alkylations, dont 2 DNA-glycosylases de la famille des DNA-glycosylases à motif hélice-coude-hélice : la 3-méthyl-adénine DNA Glycosylase II ou AlkA, qui élimine les bases alkylées de type 3-méthyl-adénine, 3-méthyl-guanine et autres en coupant la liaison glycosidique C1'-N et la 3-méthyl-adénine DNA Glycosylase I ou Tag, qui, contrairement à AlkA, a une expression constitutive et non inductible et qui élimine quasi-exclusivement les bases 3-méthyl-adénine (Bjelland *et al.*, 1993; Eichman *et al.*, 2003; Hollis *et al.*, 2000; O'Brien and Ellenberger, 2004). La rupture de la liaison glycosidique provoque l'apparition temporaire d'un site abasique avant incorporation de la base correcte (Figure 3).

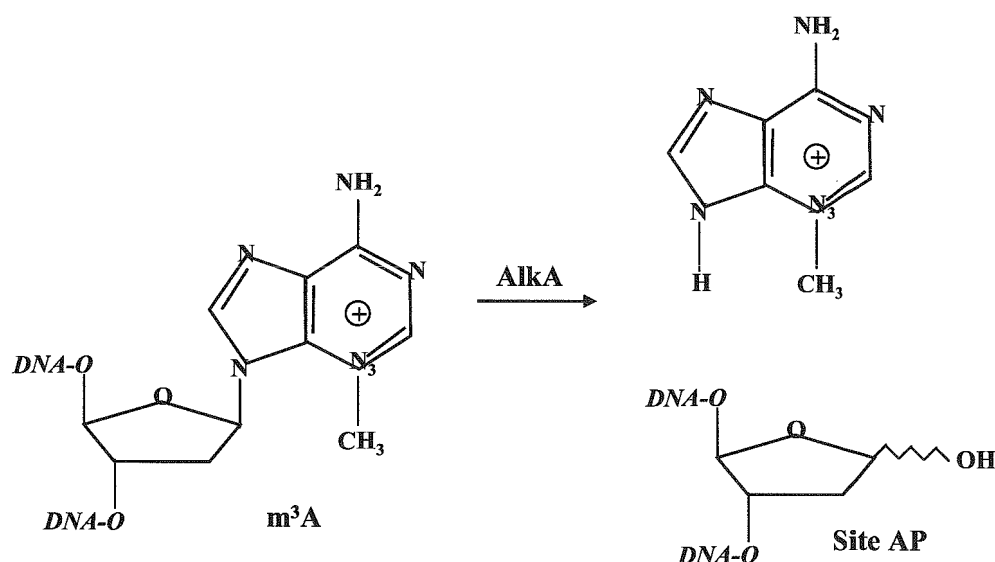


Figure 3 : AlkA catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique liant la 3-méthyl-adénine (m^3A) au squelette d'ADN. Le site abasique (Site AP) résultant est ensuite remplacé par le nucléotide correct (d'après Labahn *et al.*, 1996).

La protéine Ada, quant à elle, intervient dans le déméthylation des bases O6-méthyl-guanine par transfert du groupement méthyl sur deux de ses Cystéines internes (Dinglay *et al.*, 2000). Une fois méthylée, la protéine Ada est définitivement inactivée, rendant ce moyen de réparation des alkylations vite saturable (Moore *et al.*, 1994). Enfin, le gène *alkB*, situé dans l'opéron *ada-alkB*, est transcrit à partir du promoteur situé en amont du gène *ada* et code la protéine AlkB. Celle-ci jouerait un rôle, comme AlkA, dans la réparation des alkylations, mais plus particulièrement sur l'ADN simple brin (Dinglay *et al.*, 2000). Les protéines AlkA, Ada et AlkB sont très conservées

chez de nombreux organismes, des bactéries à l'homme, montrant leur rôle important dans la réparation des lésions spontanées de l'ADN.

Une des autres modifications de bases est la désamination spontanée, qui provoque la modification des adénines en hypoxanthines, des guanines en xanthines et des cytosines en uraciles, ce dernier événement étant le plus fréquent et provoquant une mutation de type transition puisque un uracile s'apparie à une adénine. L'uracile N-glycosylase (ou Ung) et l'hypoxanthine N-glycosylase coupent la liaison N-glucosidique entre la base et le désoxyribose, laissant temporairement un site abasique (Seeberg *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2002).

Que ce soit dans la réparation des événements d'alkylations ou de désaminations, une des étapes consiste en la formation d'un site abasique devant être réparé. La réparation des sites abasiques se fait chez *E. coli* grâce à l'intervention des endonucléases ExoIII (codée par *xth*) et EndoIV (codée par *nfo*), qui clivent en 5' du site abasique, d'enzymes AP-lyases, qui clivent en 3', puis la polymérase polI et la ligase achèvent le processus de réparation (Seeberg *et al.*, 1995).

Enfin, la formation de dimères de thymine est une lésion fréquente dans l'ADN. La photolyase, réactive à la lumière, intervient dans la dissociation de ces dimères (Kao *et al.*, 2005). De même, l'endonucléase UvrABC reconnaît la déformation due à la présence de 2 thymines dimérisées et coupe l'ADN à ce niveau (Hsu *et al.*, 1995). L'intervention de l'hélicase UvrD, de la polymérase polI et de la ligase permet de réparer totalement la lésion.

1.3.2 Réparation des lésions causées par les espèces oxygène réactives (ROS)

Les ROS (Reactive Oxygen Species) sont des produits naturellement issus du métabolisme cellulaire aérobie qui endommagent l'ADN. La lésion la plus fréquemment rencontrée est la présence de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP (ou 8-oxo-G). Un certain nombre de systèmes permet la réparation de ces lésions afin de prévenir l'apparition d'événements de mutation de type transversion. En effet, le 8-oxo-G est capable de s'associer à une cytosine ou une adénine. Dans ce deuxième cas, une mutation de type transversion pourra apparaître puisqu'à la prochaine réplication, cette adénine s'associera à une thymine au lieu d'une guanine.

Le système GO est composé d'au moins 3 protéines essentielles : MutT, MutY et MutM (Michaels and Miller, 1992). La présence dans le pool nucléotidique de 8-oxo-G comme substrat

pour l'ADN polymérase polIII, au même titre que les 4 autres nucléotides normalement incorporés, va provoquer son incorporation indifféremment en face d'une cytosine ou d'une adénine et pourra être à l'origine d'une transversion. MutT est une 8-oxo-GTPase qui prévient l'incorporation de 8-oxo-G dans l'ADN en hydrolysant le 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGMP, qui n'est plus un substrat pour la synthèse d'ADN. MutT est également capable d'hydrolyser le 8-oxo-rGTP, avec la même efficacité que le 8-oxo-dGTP, et prévient ainsi son incorporation lors de la synthèse d'ARN, assurant donc également une fonction dans la fidélité de la transcription (Shimokawa *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 1997a). MutT est retrouvée chez de nombreux organismes, des bactéries aux hommes, ce qui montre l'importance de son rôle dans le processus de maintien de l'information génétique.

MutY est une DNA-glycosylase de la famille des DNA-glycosylases à motif hélice-coude-hélice (Huffman *et al.*, 2005). Elle reconnaît les mésappariements 8-oxo-G : adénine et excise l'adénine en laissant un site abasique, au niveau duquel va être incorporé une cytosine (Fromme *et al.*, 2004; McCann and Berti, 2003). Elle est également capable de reconnaître les mésappariements 8-oxo-G : guanine, empêchant la formation de transversions guanine : cytosine en cytosine : guanine (Zhang *et al.*, 1998).

MutM (ou Fpg) possède 2 activités enzymatiques : DNA-glycosylase (de la famille hélice-2 tours-hélice) et AP-lyase (Huffman *et al.*, 2005; Lee and Chung, 2003). Elle reconnaît les mésappariements 8-oxo-G : cytosine et excise le 8-oxo-G, à la place duquel va être incorporé une guanine (Fromme and Verdine, 2003). La protéine MutM prévient également les événements de recombinaison non homologue, événements stimulés par des agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (Onda *et al.*, 1999; Ouchane *et al.*, 1997).

Ainsi, l'excision d'un 8-oxo-G et le retour à la séquence nucléotidique correcte va être le résultat de l'intervention de MutY dans un premier temps, afin de restaurer la cytosine sur un brin, puis de MutM, afin de restaurer la guanine sur l'autre brin.

2 Facteurs endogènes augmentant la mutabilité

2.1 Notion de gènes mutateurs

2.1.1 Définition

Un gène mutateur est un gène dont la mutation ou la variation d'expression provoque une forte augmentation du taux de mutation dans la cellule, qui entre dans un état qualifié d'« hypermutable ». S'il s'agit d'une mutation dans un gène mutateur, l'état mutateur est héréditaire ; s'il s'agit d'une variation d'expression, l'état mutateur est transitoire. Par exemple, une mutation dans l'un des gènes intervenant dans les mécanismes de maintien de l'intégrité de la séquence nucléotidique présentés ci-dessus, c'est-à-dire dont la fonction normale est d'éviter les erreurs et de maintenir un taux de mutation le plus faible possible, va engendrer une augmentation héréditaire du taux de mutation dans la cellule.

2.1.2 Mutation dans les gènes des systèmes de maintien de l'information génétique

2.1.2.1 *Mutation ou variation d'expression des gènes du système MMR*

Chez *E. coli*, la mutation dans un des gènes *mutH*, *mutS*, *mutL* ou *dam*, intervenant dans le système de réparation MMR, provoque une augmentation du taux de mutation dans la cellule.

Ainsi, dans un contexte *dam*⁻, aucun des 2 brins n'est méthylé et le système MMR ne peut discriminer le brin nouvellement synthétisé. La réparation d'un mésappariement se fera donc de façon aléatoire en faveur du brin parental ou du brin néosynthétisé, conduisant dans le deuxième cas à la fixation de la mutation.

Des souches déficientes dans un des gènes *mutS*, *mutH* ou *mutL* présentent des taux de mutation très élevés (100 à 1000 fois supérieurs à une souche sauvage). L'analyse du type de mutations engendrées révèle un pattern similaire pour les 3 mutants, montrant qu'ils appartiennent à un seul et même système de réparation. Les mutations les plus fréquemment observées chez ces mutants dépourvus d'un système MMR actif sont des substitutions (75 %) et des délétions d'une

base (25 %). Parmi les événements de substitutions, la très grande majorité (96-97 %) consiste en des mutations de type transition (Leong *et al.*, 1986; Schaaper and Dunn, 1987). D'autre part, il a été montré que le système MMR n'était pas exprimé de façon constitutive, mais qu'il était modulé par l'état physiologique de la cellule. Ainsi, le taux de protéines MutS et MutH diminue en phase stationnaire alors que le taux de la protéine MutL reste constant même après plusieurs jours de phase stationnaire (Feng *et al.*, 1996). Les mutations qui apparaissent en phase stationnaire présentent un spectre similaire à celui observé chez des souches déficientes pour le système MMR, montrant le lien entre baisse du taux des protéines du système MMR lors de l'entrée en phase stationnaire et accumulation de mutations (Harris *et al.*, 1999). Cependant l'implication exclusive du système MMR dans la formation de mutations de phase stationnaire, dont les mutations adaptatives, reste au centre des discussions scientifiques (Foster, 1999; Harris *et al.*, 1999). Il a été montré très récemment chez *Pseudomonas putida* que le taux de substitution était supérieur dans une souche déficiente dans le système MMR que dans une souche sauvage en phase stationnaire et que le spectre de substitutions observé dans ces 2 conditions était distinct, suggérant l'implication d'autres mécanismes que le système MMR dans l'apparition de mutations de phase stationnaire chez cette espèce (Saumaa *et al.*, 2006).

Enfin, des souches déficientes pour les protéines MutS ou MutL présentent un taux de recombinaison homéologue plus élevé qu'une souche sauvage, ce qui se traduit par exemple par des événements de recombinaison interspécifique entre *S. typhimurium* et *E. coli* (Funchain *et al.*, 2001; Rayssiguier *et al.*, 1989; Stambuk and Radman, 1998).

La survie des cellules est donc fortement dépendante d'un système de réparation de type MMR, qui permet le maintien d'un faible taux de mutation. Un exemple récent découvert chez l'Homme permet d'illustrer l'importance de ce système. Il a été observé lors de l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* des tissus gastriques d'un homme, une accumulation de MSI (pour MicroSatellite Instability) au niveau de l'ADN des cellules humaines, consistant en une augmentation du nombre de répétitions d'une séquence répétée, caractéristique de cellules déficientes pour le système de type MMR. Il a ainsi été proposé que *H. pylori* inhiberait le système de réparation post-répllicative de son hôte, provoquant une augmentation du taux de mutation. Ceci a pour conséquence l'augmentation du risque de développement d'un cancer gastrique suite à l'infection (Park *et al.*, 2005).

2.1.2.2 Mutation dans les gènes codant les sous-unités de polymérases : exemple de *dnaE*, *dnaQ*, *dnaX* et *polA*

Des mutations dans le gène *dnaE*, qui code la sous-unité α de la polymérase polIII, peuvent avoir un effet mutateur, en augmentant la fréquence d'incorporation de nucléotides incorrects suite à une baisse du discernement entre nucléotides corrects et incorrects par la sous-unité α . Paradoxalement, des mutations dans ce gène peuvent avoir l'effet inverse, à savoir un effet antimutateur (Fijalkowska and Schaaper, 1995; Oller and Schaaper, 1994). Quatre hypothèses ont été proposées pour expliquer cet effet antimutateur : un meilleur discernement des nucléotides à incorporer, une meilleure relecture par la sous-unité ϵ par modification de la communication entre ces 2 sous-unités, une vitesse de synthèse plus lente laissant plus de temps pour la relecture et la correction ou une dissociation de l'ADN polymérase. Un double mutant *dnaE* antimutateur et *dnaQ* (substitution d'un acide aminé entraînant une activité exonucléase de 2 % par rapport à une souche sauvage) présente toujours un phénotype antimutateur, montrant que la sous-unité ϵ n'intervient pas dans l'effet observé. La répartition des mutations à effet antimutateur tout au long du gène *dnaE* hors des motifs conservés et l'apparition plus fréquente de souches antimutatrices que de souches mutatrices ont conduit les auteurs à rejeter l'hypothèse selon laquelle le discernement des mutants antimutateurs serait meilleur. L'hypothèse retenue par les auteurs est donc celle impliquant une dissociation de l'ADN polymérase (Figure 4). Après l'insertion d'un nucléotide, qu'il soit correct ou incorrect, 3 voies sont possibles : l'extension (l'insertion du nucléotide suivant), la relecture (activité exonucléase) ou la dissociation de la polymérase de l'extrémité 3'. Si le nucléotide inséré est correct, le phénomène d'extension est majoritaire. Si un appariement incorrect est présent à l'extrémité terminale, le phénomène d'extension diminue et celui de relecture augmente, pouvant s'accompagner d'une dissociation complète ou partielle de la polymérase. Cette dissociation laisse libre l'extrémité 3' comme substrat pour des exonucléases, avant la réassociation et la reprise de la réplication. La polymérase antimutatrice présenterait la capacité de se dissocier plus facilement, ce qui expliquerait le plus faible taux de mutation à l'issue du processus de réplication (Fijalkowska and Schaaper, 1995).

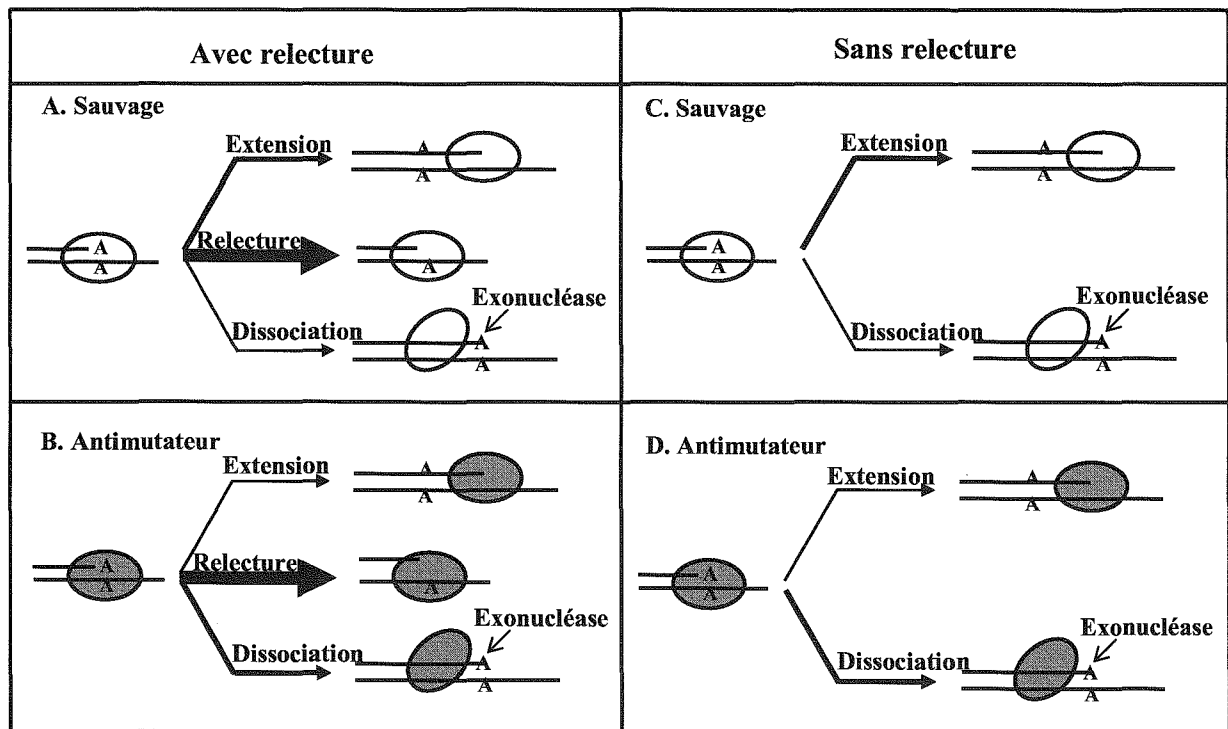


Figure 4 : Modèle de l'action antimutatrice d'un allèle *dnaE*. Les ovales représentent la polymérase placée au niveau d'un mésappariement terminal adénine (A) : adénine (A). Les ovales en pointillés représentent les polymérases antimutatrices. Les différentes épaisseurs de flèches sont employées pour illustrer les variations dans l'importance relative des voies indiquées : plus les flèches sont épaisses, plus la voie concernée est utilisée. La dissociation partielle (ou glissement arrière) de l'enzyme est indiquée mais n'est qu'hypothétique. L'exonucléase représente l'action d'une exonucléase 3' aspécifique capable de dégrader l'extrémité 3' (d'après Fijalkowska and Schaaper, 1995).

Chez *E. coli*, des mutations dans le gène *dnaQ*, qui code la sous-unité ϵ de l'ADN polymérase responsable de l'activité exonucléase 3'-5', aboutissent à un phénotype mutateur ou antimutateur et des mutants présentant une activité exonucléase de 32 à 155 % par rapport à une souche présentant un allèle *dnaQ* sauvage ont été caractérisés (Lehtinen and Perrino, 2004). La partie N-terminale de DnaQ présente l'activité exonucléase à proprement parler alors que la partie C-terminale permettrait la liaison à la sous-unité α . Une mutation dans la partie N-terminale de DnaQ aboutit à un phénotype mutateur expliqué par la baisse de la capacité de relecture par la sous-unité ϵ , mais une mutation dans l'extrémité C-terminale provoque le même effet, malgré une activité exonucléase intacte en N-terminal. Il a été proposé que l'intime liaison entre les sous-unités α et ϵ de l'ADN polymérase polIII, établie grâce à l'extrémité C-terminale de DnaQ, soit indispensable à la relecture correcte par DnaQ (Lehtinen and Perrino, 2004).

Enfin, il a récemment été proposé que certains ARN de transfert pourraient conférer un phénotype mutateur en agissant sur la sous-unité ϵ (Dorazi, 2003). Des premières observations ont

révélé qu'une forte expression de *mutA*, qui code un ARN de transfert, provoquait une augmentation d'un facteur 10 du taux de mutation. L'hypothèse proposée était que cette surexpression entraînait une mauvaise traduction de la sous-unité ϵ . Une hypothèse alternative a par la suite été proposée, après une analyse par comparaison de séquences : lors d'une carence en acides aminés, le nombre d'ARN de transfert non chargés augmente et un certain nombre d'entre eux (*mutA*, *glyV^{glu}*, *alaV^{glu}*) sont complémentaires à la séquence située entre les 2 promoteurs de *dnaQ*. Ils pourraient ainsi s'hybrider à l'ARN messenger issu du promoteur P1, à la manière d'ARN antisens, à proximité du rbs, et empêcher la fixation du ribosome et l'initiation de la traduction de *dnaQ*. Même si la traduction à partir de l'ARN messenger issu du promoteur P2 n'est pas affectée, le taux de sous-unité ϵ est diminué dans la cellule ce qui provoque une augmentation du taux de mutation dans la cellule. En effet, la polymérase polIII peut se trouver sous 3 formes : la forme I, « error-free », dans laquelle chaque monomère est associé à une sous-unité ϵ ; la forme III, « error-prone », formée lorsque *dnaQ* est muté et ϵ absent et la forme II, correspondant au cas décrit ci-dessus, dans laquelle la sous-unité ϵ est limitante, ce qui conduit à un monomère « error-free » et un monomère « error-prone » (Figure 5).

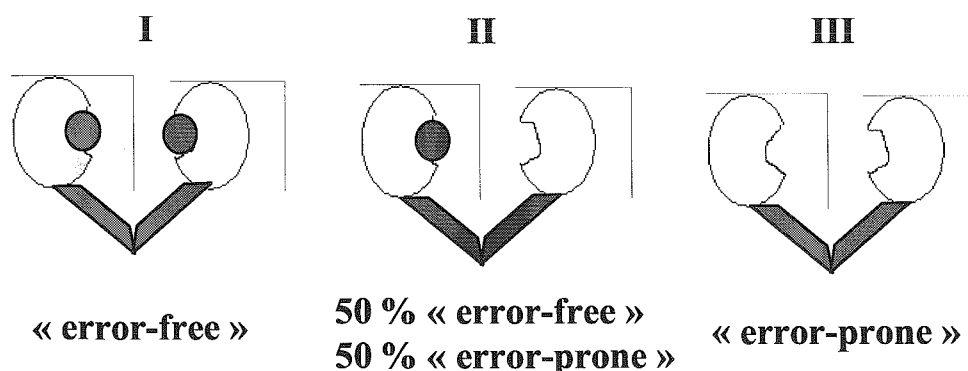


Figure 5 : Les 3 formes possibles du « core » de l'ADN polymérase III. Les sous-unités représentées sont α (ovales blancs), ϵ (ronds gris) et τ (trapèzes gris) (d'après Dorazi, 2003).

Récemment, un phénotype mutateur a été associé à des mutations dans le gène *dnaX*, qui code les sous-unités γ et τ de la polymérase polIII (Pham *et al.*, 2006). Sept mutations conduisant à une augmentation du taux de mutation ont été identifiées dans ce gène. Dans chacun des cas, la sous-unité τ est la sous-unité affectée, ce qui montre son rôle essentiel dans la fidélité de la réplication. Le phénotype mutateur conféré par une sous-unité τ mutante consiste en une augmentation des mutations de type transversions et frameshift -1.

Concernant la polymérase polII, codée par *polA*, Patel *et al.* (2001) proposent que 2 types de

mutations pourraient réduire la fidélité de cette polymérase : une mutation qui stabiliserait la conformation fermée et une mutation qui élargirait la poche hydrophobe, la rendant plus sujette à des liaisons avec des nucléotides non complémentaires.

D'autre part, une mutation dans le domaine Klenow n'a pas la même conséquence d'un point de vue mutationnel qu'une mutation dans le domaine exonucléase 5'-3' : il a été montré que dans le premier cas, une augmentation des délétions et des frameshift -1 était observée alors que dans le second, les mutations étaient plutôt de type duplication et frameshift +1 (Nagata *et al.*, 2002; Tago *et al.*, 2005).

2.1.2.3 Mutation dans les gènes intervenant dans la recombinaison : exemples de *recG* et *recA*

Une mutation dans un des gènes contrôlant les mécanismes de recombinaison pourra avoir un effet mutateur. Par exemple, un mutant d'*E. coli* déficient pour la protéine RecG, hélicase intervenant dans la dissociation des jonctions formées lors de la migration de la croix de Holliday, présente une augmentation de la fréquence de réarrangements chromosomiques RecF-dépendants et une augmentation de plusieurs centaines de fois par rapport à une souche sauvage du nombre d'événements de type frameshift en phase stationnaire de croissance (Bichara *et al.*, 2006; Horst *et al.*, 1999). De plus, l'inactivation du gène *recG* provoque l'induction du système SOS, au cours duquel de nombreuses mutations sont produites, comme cela sera présenté plus loin (Lloyd and Buckman, 1991). Enfin, le taux de protéines MutS et MutH est beaucoup plus faible dans un contexte *recG* que dans un contexte sauvage (Stambuk and Radman, 1998).

RecA est une protéine de liaison à l'ADN, indispensable au processus de recombinaison homologue et à l'induction du système SOS. Pour induire le système SOS, RecA acquiert une activité de protéase et devient RecA*. Cette induction provoque une augmentation très importante du taux de mutation. Certaines mutations dans le gène *recA* provoquent une expression constitutive de la forme RecA* donc une expression permanente du régulon SOS, résultant en une augmentation de la mutabilité globale dans le génome, notamment une hausse de 10 à 20 fois du nombre d'événements de transversions guanine : cytosine en thymine : adénine et adénine : thymine en thymine : adénine (Horst *et al.*, 1999; Lavery and Kowalczykowski, 1992; Watanabe-Akanuma *et al.*, 1997).

2.1.2.4 Mutation dans les gènes *mutM*, *mutY* ou *mutT*

Des mutations dans un des gènes du système GO de réparation des 8-oxo-G aboutit également à un phénotype mutateur. Un mutant déficient dans le gène *mutT* n'est plus capable d'hydrolyser la 8-oxo-G avant son incorporation dans l'ADN au cours du processus de réplication et le taux de transversions adénine : thymine en cytosine : guanine est augmenté d'un facteur 1000 par rapport à une souche sauvage (Taddei *et al.*, 1997a). Un mutant dans les gènes *mutY* ou *mutM* présente un taux de transversions guanine : cytosine en thymine : adénine fortement augmenté par rapport à une souche sauvage car il est incapable de corriger respectivement les mésappariements 8-oxo-G : adénine et les 8-oxo-G : cytosine (Fromme *et al.*, 2004; Michaels *et al.*, 1992). Cette augmentation est encore plus importante chez le double mutant *mutY mutM* qui présente un taux de mutation 25 à 75 fois plus élevé que les 2 simples mutants, chez lesquels une des 2 glycosylases reste active (Michaels *et al.*, 1992).

2.2 La transcription, source de mutation

Il a été montré que l'ADN sous forme simple brin est beaucoup plus sensible aux réactions d'hydrolyse que ne l'est l'ADN double brin. La transcription, processus durant lequel le brin codant est transitoirement sous forme simple brin, donc vulnérable, est de ce fait source de mutations. Ainsi, des événements de transition cytosine : guanine en thymine : adénine sont fréquemment observés sur le brin non transcrit (Beletskii and Bhagwat, 1996). La cytosine étant la base la plus instable des 4, elle est fortement sujette à des événements de désamination lorsque l'ADN se trouve sous forme simple brin et cette désamination provoque l'apparition d'un uracile, qui s'apparie normalement à une adénine. Ce type de modification aboutit donc à une mutation de type transition cytosine : guanine en thymine : adénine. Cette mutation n'est pas la seule qui affecte le brin non transcrit lors du processus de transcription et des événements de transitions ou de transversions sont observés à haute fréquence (Klapacz and Bhagwat, 2002).

D'autre part, plus un gène sera transcrit activement, plus le brin codant se trouvera longtemps sous forme simple brin et plus les mutations pourront s'accumuler. Ainsi, il a été montré que lors d'une carence en leucine chez une souche d'*E. coli* auxotrophe pour cet acide aminé, le taux de transcription de l'opéron *leu*, permettant la biosynthèse de cet acide aminé, est fortement augmenté, de façon spécifique. Parallèlement, une augmentation du taux de réversion *leu*⁻ vers *leu*⁺ est

observée, montrant un lien fort entre augmentation de la transcription et augmentation du taux de mutation (Wright *et al.*, 1999).

Enfin, lors d'une très forte transcription, le taux de super-enroulements négatifs de l'ADN est accru en amont de l'ARN polymérase. Ces super-enroulements sont sources de mutation car ils favorisent la formation de structures tige-boucle, cibles de nucléases, et ainsi la formation de bases mal ou non appariées (Wright, 2000).

2.3 Le système SOS

2.3.1 Induction en phase stationnaire

Le système SOS est un système de survie induit par des agents chimiques ou physiques extérieurs endommageant directement ou indirectement l'ADN ou par une modification de l'état physiologique de la bactérie. Ainsi, une exposition aux U.V., à des rayons γ ou à des rayons X ou encore la présence dans le milieu de croissance de mitomycine C, d'aflatoxine B1 ou de benzo- α -pyrène vont endommager l'ADN et provoquer l'induction du système SOS. De même, lors de l'étape de transition entre phase exponentielle de croissance et phase stationnaire, la production d'AMP cyclique augmente et provoque l'induction du système SOS. Cette induction se fait de façon intracellulaire mais l'AMP cyclique sert également de signal entre les cellules d'une colonie puisque la plus grande partie de l'AMP cyclique produit est excrétée hors de la cellule. Il peut donc y avoir induction de ce système de survie dans l'ensemble de la colonie (Taddei *et al.*, 1995).

Le système SOS est induit quand la cellule perçoit de l'ADN simple brin (par exemple suite à l'action d'agents mutagènes) ou lorsque la réplication est bloquée (par exemple lors de l'entrée en phase stationnaire). Dans les 2 cas, de l'ADN simple brin s'accumule et va être la cible de la protéine RecA. En présence d'ATP, la protéine RecA va acquérir une activité protéasique et devenir RecA* qui va cliver le répresseur du régulon SOS, la protéine LexA. Ce régulon, composé de plus de 30 gènes, dont *recA* et des gènes intervenant dans la réponse au stress et dans la recombinaison, est alors directement déréprimé par la fixation de la protéine LexA (Courcelle *et al.*, 2001). *E. coli* possède 2 polymérases « error-prone » de la famille Y : polIV (codée par *dinB*) et polV (codée par *umuCD*). Les gènes *dinB* et *umuCD* font partie du régulon SOS et les protéines polIV, UmuC et UmuD sont produites en réponse au système SOS (Figure 6). RecA* participe au clivage de la protéine UmuD pour donner UmuD' qui, avec UmuC, va former le complexe UmuD'₂C, qui est la polymérase polV active (Janion, 2001; Tang *et al.*, 1999). De plus, une polymérase « error-free »

appartenant à la famille B fait partie du régulon SOS, polII, codée par *polB* (Banach-Orlowska *et al.*, 2005).

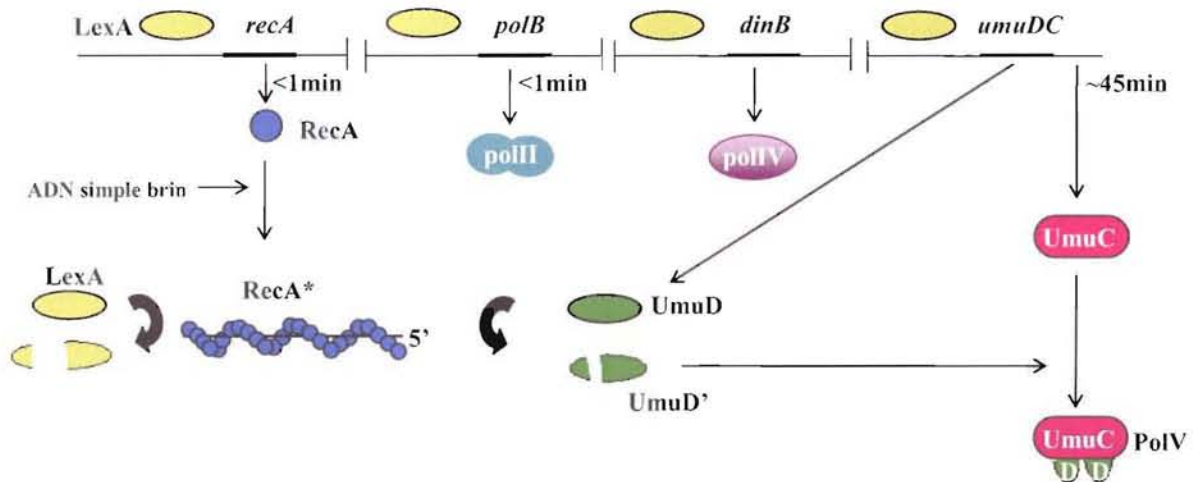


Figure 6 : Induction du système SOS chez *E. coli* : la fixation du répresseur LexA en amont des gènes du système SOS empêche leur expression en phase exponentielle de croissance. Lorsque de l'ADN est anormalement présent sous forme simple brin, RecA est induite et activée, provoquant le clivage de LexA et l'induction du régulon SOS, ainsi que le clivage d'UmuD et l'activation de la polymérase polIV (d'après Goodman, 2002).

Il existe donc des phases de survie durant lesquelles le maintien de l'information génétique dans les cellules n'est plus assuré. L'induction de polymérases « error-prone », *via* l'induction du système SOS, permet d'outrepasser les lésions qui s'accumulent au niveau de l'ADN et bloquent la fourche de réplication. Les polymérases polIV et polV ne possèdent pas d'activité exonucléasique 3'-5', empêchant la relecture et les rendant donc beaucoup moins fidèles que polI et polIII (Godoy *et al.*, 2006; Goodman, 2002; Wagner *et al.*, 1999). La polymérase polV est la plus « error-prone » : elle est capable d'outrepasser les sites abasiques de façon 50 à 100 fois plus efficace que les polymérases polI, polII et polIII, en incorporant en face majoritairement une adénine et minoritairement une guanine (Reuven *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999). Le processus de réplication peut donc se poursuivre, mais la fidélité de l'information génétique n'est temporairement plus assurée.

Ainsi, lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance, les bactéries passent par un état hypermutable induit par le déclenchement du système SOS et l'intervention de polymérases « error-prone ». Le système SOS peut rapidement être réprimé une fois les conditions de croissance redevenues favorables et constitue donc un mécanisme efficace de modulation rapide et transitoire non seulement de l'expression génique mais également du taux de mutation.

2.3.2 Induction par reconnaissance d'ADN étranger

Lorsqu'une cellule perçoit de l'ADN étranger dans son cytoplasme, il y a induction du système SOS parce que l'ADN étranger est sous forme simple brin, comme lorsque de l'ADN endogène est endommagé. La protéine RecA initie le processus de recombinaison homologue. Pour qu'il y ait recombinaison homologue par RecA, il faut un MEPS (pour Minimum Efficient Processing Segment) qui, chez *E. coli*, est compris entre 23 et 27 pb. Plus l'homologie entre l'ADN reçu et l'ADN de la bactérie receveuse est faible, plus la probabilité pour RecA de rencontrer un MEPS diminue. Cependant, une fois le processus de recombinaison par RecA initié, la recombinaison peut se faire malgré l'hétérologie des séquences. L'induction du système SOS augmente de façon exponentielle avec l'augmentation linéaire du pourcentage de divergence. Ainsi, lorsqu'une cellule acquiert un fragment d'ADN étranger, plus la divergence est grande, plus le taux de RecA* est élevé, plus le taux de mutation va augmenter par induction de polymérases « error-prone » (Delmas and Matic, 2005). Cependant, le processus d'échange de matériel génétique ne va pas aboutir puisque le système MMR et notamment les composants MutS et MutL vont faire avorter la recombinaison RecA-dépendante (Matic *et al.*, 1995; Vulic *et al.*, 1997; Worth *et al.*, 1994). Il a été proposé que le système MMR n'agisse pas seulement après l'échange de brin mais qu'il joue également un rôle dans le maintien de la fidélité de l'information génétique en imposant une rigueur accrue à RecA dans la recherche d'homologies entre ADN donneur et ADN receveur (Delmas and Matic, 2005).

3 Facteurs environnementaux augmentant la mutabilité

Outre les facteurs décrits précédemment qui peuvent entraîner l'entrée des bactéries dans un état hypermutable, de nombreuses situations environnementales vont avoir une influence sur le taux de mutation des bactéries. Les bactéries se trouvent rarement dans des conditions permettant une croissance exponentielle mais de nombreuses modifications de l'environnement surviennent, appelées stress physiques ou chimiques, qui endommagent directement ou indirectement l'ADN et auxquelles les bactéries doivent s'adapter pour survivre.

3.1 Intervention des facteurs σ -alternatifs

La modification des conditions environnementales (telles que variations de la température ou de la pression osmotique) provoque un changement du métabolisme de la bactérie notamment *via* l'activation de facteurs σ -alternatifs. En conditions permettant une croissance exponentielle, l'ARN polymérase est associé au facteur σ^{70} primaire, codé par *rpoD* chez *E. coli*, *mysA* chez *Mycobacterium* et *hrdB* chez *Streptomyces*, et transcrit les gènes σ^{70} -dépendants, c'est-à-dire principalement les gènes de ménage (Wosten, 1998). La fixation de facteurs σ -alternatifs au « core » de l'ARN polymérase va permettre d'activer des gènes particuliers et de répondre au stress considéré. Par exemple lors d'un stress thermique chez *E. coli*, le facteur σ^{32} , codé par *rpoH*, est induit suite à l'accumulation de protéines partiellement dénaturées. En effet, lorsque la température est optimale, la protéine chaperone DnaK séquestre σ^{32} et le complexe est dégradé par FtsH. Lorsque la température augmente, les protéines partiellement dénaturées s'accumulent et DnaK est très affine pour ces protéines, libérant ainsi σ^{32} . Son taux augmente alors de 20 fois et les gènes σ^{32} -dépendants sont activés (Wosten, 1998). Parmi ces gènes, le gène *groE* code la protéine GroE, protéine chaperone qui aide les protéines essentielles à retrouver et maintenir leur bonne conformation. GroE protège également polV de la dégradation et induit indirectement l'expression de polIV (Foster, 2005). Ainsi, cette action positive sur les 2 polymérases les plus « error-prone » d'*E. coli* suggère que la réponse au stress thermique *via* l'activation de σ^{32} et de GroE pourrait engendrer une augmentation du taux de mutation.

3.2 RpoS, facteur général de la réponse au stress

3.2.1 Mode d'action de σ^S et régulon *rpoS*

Le facteur σ^S (S pour Stress), codé par *rpoS*, appartient à la sous-famille des facteurs σ non essentiels à la survie en phase exponentielle de croissance (Wosten, 1998). Il a d'abord été identifié chez *E. coli* comme un facteur σ intervenant lors de la mise en place de la phase stationnaire. Puis, différentes études ont montré qu'il était également impliqué dans la réponse à de nombreux stress, tels que stress osmotique, acide ou thermique, autant de stress qui provoquent une baisse du taux de la croissance bactérienne (Hengge-Aronis, 1996; Lee *et al.*, 1995; Muffler *et al.*, 1997). Il est donc à

présent considéré comme un régulateur majeur de la réponse au stress chez *E. coli* et contrôle directement ou indirectement l'activité de plus de 140 gènes (Weber *et al.*, 2005). Ce gène est retrouvé chez de nombreuses bactéries à coloration Gram négative, comme le spirochète *Borrelia burgdorferi* et les protéobactéries des groupes α , β , γ et δ , telles que *Geobacter sulfurreducens*, espèce chez laquelle il a été montré par l'analyse de microarray que l'expression de 294 gènes était affectée de façon directe ou indirecte par le facteur σ^S , soit près d'un dixième du génome (Nunez *et al.*, 2006).

Chez *E. coli*, l'activation des gènes du régulon *rpoS* dépend de l'activité de σ^S , activité qui peut être contrôlée *via* de nombreux mécanismes, suivant le stress détecté. Ainsi, l'entrée en phase stationnaire va augmenter la transcription de *rpoS* alors qu'une augmentation de la pression osmotique va favoriser la traduction de RpoS et une augmentation de la température va inhiber sa protéolyse (Figure 7).

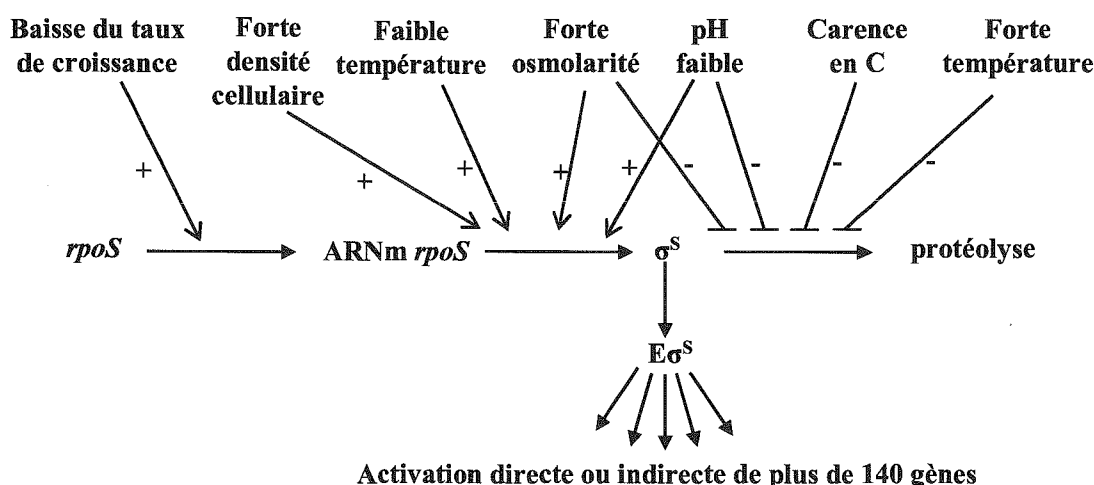


Figure 7 : Le taux de σ^S est différemment affecté par les conditions de stress. Ainsi, l'augmentation intracellulaire de la concentration en σ^S peut être due à une augmentation de sa transcription, de sa traduction ou l'inhibition de sa protéolyse. L'induction la plus forte et la plus rapide combine plusieurs de ces régulations (d'après Hengge-Aronis, 2002a). $E\sigma^S$ représente l'ARN polymérase sous forme holoenzyme, liée au facteur σ^S .

En phase exponentielle de croissance, le taux de σ^S est quasiment nul, mais peut rapidement être augmenté de 20 fois en réponse à un stress ou lors du passage en phase stationnaire (Pruteanu and Hengge-Aronis, 2002). Cette induction rapide est expliquée par le large panel de mécanismes permettant la régulation de ce facteur σ .

Ainsi, la transcription de *rpoS* peut être affectée par différentes molécules, telles que le (p)ppGpp, produit lors d'une limitation en acides aminés, qui va influencer l'élongation ou la stabilité du transcrit, les polyphosphates inorganiques, qui auraient une action indirecte sur la

transcription ou encore la concentration en complexe AMP cyclique-CRP (cAMP Response Protein). En phase exponentielle de croissance, l'AMP cyclique régule négativement la transcription de *rpoS*, puis positivement lorsque les cellules passent en phase de transition puis en phase stationnaire (Hengge-Aronis, 2002a). Cet effet antagoniste pourrait s'expliquer par la présence de 2 sites de liaison du complexe AMP cyclique-CRP, en amont et en aval du promoteur de *rpoS* (Figure 8). La position de ces sites suggère qu'ils pourraient jouer pour l'un le rôle d'activateur et pour l'autre celui de répresseur. En effet, la position du site situé en amont est similaire à celle identifiée au niveau de l'opéron *lac* pour lequel le complexe AMP cyclique – CRP joue le rôle d'activateur. Le second site, en aval du site d'initiation de la transcription pourrait jouer un rôle inhibiteur.

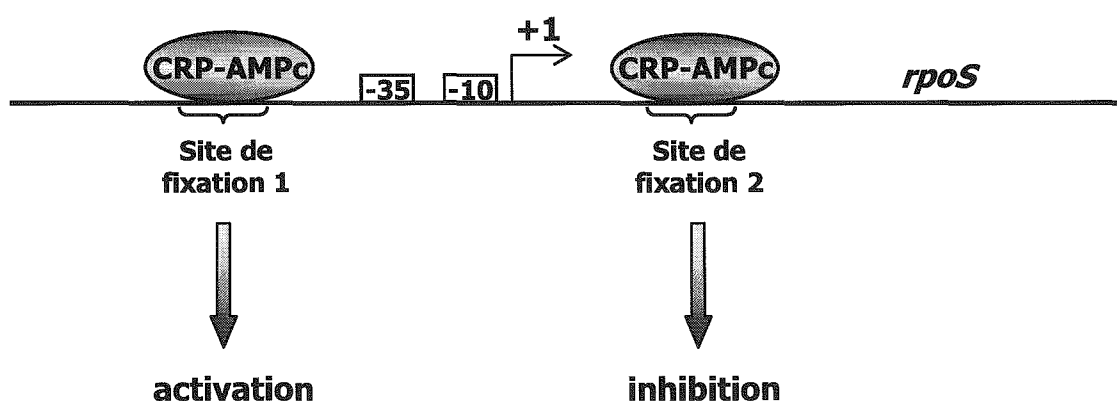


Figure 8 : Représentation schématique des sites de fixation du complexe AMP cyclique-CRP (CRP-AMPc) au niveau de la région promotrice du gène *rpoS*. Les boîtes -35 et -10 ainsi que le site d'initiation de la transcription (+1) sont indiqués. La liaison au niveau du site de fixation 1 permettrait une activation de la transcription alors qu'une liaison au site de fixation 2 provoquerait une inhibition (d'après Hengge-Aronis, 2002a).

La traduction dépend de la structure secondaire de l'ARN messager *rpoS* et de protéines, telles que Hfq ou HU, qui se lient à l'ARN messager et stimulent sa transcription, en stabilisant sa structure secondaire ou en recrutant des facteurs additionnels impliqués dans le contrôle traductionnel de *rpoS*, ou encore DnaK (protéine chaperone) et DksA (facteur de transcription) dont la perte de fonction provoque une baisse de la traduction de *rpoS*. D'autres protéines ont un effet négatif sur la traduction de *rpoS*. Par exemple la protéine H-NS est une protéine histone-like qui se lie à l'ARN messager à la façon d'une protéine chaperone de l'ARN et qui empêche ainsi sa traduction.

Une fois la traduction achevée, le facteur σ^S peut encore être régulé par protéolyse ou séquestration, le rendant inactif. En effet, RssB est un facteur anti- σ^S qui se lie à ce facteur et le complexe ainsi formé est la cible de la protéase ClpX. La protéine RssB intervient donc non seulement dans la régulation de l'activité de σ^S en s'y complexant, ce qui l'inactive, mais également

dans sa protéolyse, en le dirigeant vers ClpX (Hengge-Aronis, 2002a; Matic *et al.*, 2004).

Récemment, un système à 3 composants intervenant dans la régulation de *rpoS* a été identifié : une sensor-kinase ArcB phosphorylerait ArcA (un response-regulator) et RssB, provoquant respectivement la répression de la transcription du gène *rpoS* mais aussi la stimulation de la protéolyse de σ^S (Mika and Hengge, 2005).

Lorsque *rpoS* est induit, le taux de σ^S augmente d'un facteur 20 et le régulon RpoS est induit. Ce régulon comprend au moins 140 gènes, impliqués par exemple dans la régulation génique, les systèmes de transport, le métabolisme énergétique central, le catabolisme des glucides, la biosynthèse d'acides aminés, la structure cellulaire (Vijayakumar *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005). Ainsi, la réponse qui se met en place *via* l'activation des gènes *rpoS*-dépendants concerne principalement les voies de transports métaboliques et la résistance au stress. Alors que σ^S était considéré uniquement comme un régulateur positif de l'expression génique, de récentes études ont montré que certains gènes étaient régulés négativement par σ^S . Il s'agit par exemple des gènes impliqués dans la formation du flagelle, dont le gène *fliA*, codant un facteur σ nécessaire à la formation de cette structure cellulaire et le gène *flgM*, codant son anti- σ (Patten *et al.*, 2004).

De nombreuses études se sont focalisées sur la recherche d'une séquence consensus au niveau des promoteurs des gènes σ^S -dépendants. L'ARN polymérase couplée à σ^{70} ($E\sigma^{70}$) et celle couplée à σ^S ($E\sigma^S$) semblent reconnaître les mêmes séquences promotrices. La question a alors été de comprendre ce qui permettait la spécificité de ces 2 holoenzymes et plus particulièrement ce qui caractérisait un promoteur σ^S -dépendant. Cette spécificité a ainsi été caractérisée par la forte conservation de certains résidus, notamment la boîte -10, un C en position -12 et -13 et un TG en position -16 et -15. De plus, une séquence consensus de boîte -35 ne semble pas exister pour les promoteurs induits par des facteurs σ de phase stationnaire (Becker and Hengge-Aronis, 2001; Gaal *et al.*, 2001; Hengge-Aronis, 2002b; Lacour *et al.*, 2003; Lacour and Landini, 2004; Miksch *et al.*, 2005).

La protéine Lrp (Leucin-responsive regulatory protein) est une protéine régulatrice qui interviendrait dans la compétitivité des holoenzymes $E\sigma^{70}$ et $E\sigma^S$ en favorisant la fixation de l'une ou l'autre holoenzyme aux régions promotrices, en affectant la superstructure de l'ADN et ainsi le positionnement des nucléotides importants à la sélectivité des 2 holoenzymes (Weber *et al.*, 2005).

3.2.2 Rôle de σ^S dans l'augmentation du taux de mutation

3.2.2.1 *Activation de polymérases « error-prone »*

Chez *E. coli*, de récentes études ont mis en évidence une induction de la polymérase polIV par σ^S , de façon LexA-indépendante. La polymérase polIV est produite tardivement lors de la phase stationnaire (après 24 heures) mais le taux de polymérase polIV reste élevé pendant au moins 3 jours lors d'une culture continue et durant ce temps, où polIV devient la polymérase prépondérante, le taux de mutation est très fort. Dans un mutant *rpoS*, la concentration de polIV est réduite, ainsi que son taux de transcrit et ce mutant présente un taux de mutation de phase stationnaire réduit (Foster, 2005; Layton and Foster, 2003). D'autre part, un des gènes cibles de σ^S est la protéine chaperone GroE, qui protège la polymérase polV de la dégradation (Foster, 2005; Saint-Ruf *et al.*, 2004).

Ainsi, l'induction de σ^S en phase stationnaire va provoquer directement (pour polIV) ou indirectement (*via* GroE pour PolV) l'activation de polymérases « error-prone » et le taux de mutation global dans la cellule va augmenter.

3.2.2.2 *Inhibition du système MMR*

En phase stationnaire, la quantité de transcrit *mutS* est plus faible et la concentration de MutS baisse d'un facteur 10, celle de MutH d'un facteur 3 alors que celle de MutL demeure constante (Feng *et al.*, 1996; Kivisaar, 2003; Saint-Ruf and Matic, 2006; Tsui *et al.*, 1997). L'inhibition du système MMR est dépendante de l'expression de σ^S . En effet, un mutant inactivé dans *rpoS* présente un taux de MutS et MutH similaire en phase stationnaire et en phase exponentielle, démontrant que la baisse des concentrations de ces 2 protéines lors de l'entrée en phase stationnaire est RpoS-dépendante (Tsui *et al.*, 1997). Le taux de σ^S augmente non seulement en phase stationnaire mais aussi en phase de croissance si les bactéries sont confrontées à un stress nutritif, osmotique, acide ou thermique et la capacité de réparation du système MMR est donc régulée négativement dans des situations très variées.

3.3 Concept de mutations « adaptatives »

En 1988, Cairns et son équipe font une découverte qui va remettre en question le caractère aléatoire des mutations : ils observent que des mutations ont lieu dans des cellules en conditions de non croissance et proposent qu'elles seraient produites en réponse à une induction de l'environnement (Cairns *et al.*, 1988). En 1991, cette hypothèse est confortée par Cairns et Foster qui observent la capacité de mutants incapables de métaboliser le lactose (frameshift +1 dans le gène *lacI* porté par le plasmide conjugatif F) à réverter. Quand ces mutants sont étalés sur milieu contenant du lactose comme unique source de carbone, c'est-à-dire en phase de non croissance, l'apparition de mutations de type réversion, restaurant un phénotype Lac⁺, sont fréquentes alors que ces mutations sont rares en phase exponentielle de croissance (Cairns and Foster, 1991). Ces mutations « dirigées » vers le gène dont la réversion conférerait un avantage adaptatif ont été appelées « mutations adaptatives ». Quelques années plus tard, Foster (1997) met en évidence que le gène *lac* n'est pas la seule cible de réversion dans de telles conditions. En effet, elle observe chez des mutants *lac*⁻ *tet*^S cultivés sur milieu contenant du lactose comme unique source de carbone, des révertants *lac*⁺ mais aussi des révertants *tet*^R (Foster, 1997). Cette observation remet en cause l'idée selon laquelle les mutations qualifiées d'adaptatives n'apparaissent que dans les gènes dont la réversion permettrait une adaptation immédiate.

Les travaux menés actuellement conduisent à la conclusion que lors de la phase stationnaire de croissance, le taux de mutation augmente de façon globale dans la cellule, et non de façon dirigée comme le pensait d'abord Cairns, notamment par inhibition du système MMR et activation de polymérases « error-prone », comme nous l'avons vu précédemment (Foster, 2005; Rosche and Foster, 1999; Tompkins *et al.*, 2003). Certaines bactéries mutantes présenteraient une meilleure valeur adaptative qu'une souche sauvage dans la situation environnementale qui a entraîné l'entrée en phase stationnaire alors que des mutations dans d'autres gènes vont provoquer la baisse de la valeur adaptative d'une bactérie mutante par rapport à une souche sauvage. Ainsi, des mutants dans les polymérases polII, polIII et polIV, dans le gène de la NADH déshydrogénase I chez *E. coli* ou dans des gènes intervenant dans la compétence vont être désavantagés lors de la phase stationnaire (Finkel and Kolter, 2001; Yeiser *et al.*, 2002; Zambrano and Kolter, 1993). D'autres mutants, au contraire, vont présenter une meilleure valeur adaptative qu'une souche sauvage en conditions de non croissance. Ces mutants ont été appelés « GASP » (pour Growth Advantage in Stationary Phase). Le passage par un état mutateur transitoire augmente la probabilité d'apparition d'allèles conférant une plus forte valeur adaptative que l'allèle sauvage et l'émergence d'un polymorphisme génétique au sein d'une population bactérienne va permettre la survie de certains individus

« GASP » et donc la survie de l'espèce (Arjan *et al.*, 1999).

3.3.1 L'exemple de *lac* de FC40. Modèles d'hypermutable/amplification

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la forte fréquence de réversion de *lac* observée chez la souche FC40 d'*E. coli* étudiée par Cairns et Foster. Une des hypothèses est le passage par un état hypermutable, induit par le système SOS et s'accompagnant de l'activation de la polymérase polIV et de l'inactivation du système MMR (McKenzie *et al.*, 2001). Dans ce modèle, le taux de mutation est fortement augmenté dans les cellules en non croissance, augmentant la probabilité d'apparition d'une mutation neutre, délétère ou « adaptative », c'est-à-dire la réversion, le plus fréquemment par un frameshift -1, vers le phénotype Lac⁺ (Foster, 2004; Rosenberg, 1994). D'autres révertants ne présentaient pas de mutation dans le gène *lac* mais l'amplification de la région contenant ce gène en 20 à 50 copies (Hastings *et al.*, 2000; Hastings and Rosenberg, 2002). Cette augmentation du nombre de copies pourrait permettre d'obtenir une activité enzymatique similaire à celle d'un allèle sauvage. Enfin, un modèle combinant amplification et mutation a été suggéré (Hersh *et al.*, 2004; Roth and Andersson, 2004). Chez la souche FC40 se déroulerait un grand nombre d'événements de duplication du gène *lac* aboutissant à une augmentation du nombre de cibles mutationnelles. Le taux de mutation au niveau du gène *lac* ne serait ainsi pas augmenté mais c'est le nombre de cibles potentielles pour un événement de réversion qui le serait. Dans ce modèle, la probabilité qu'une mutation de type réversion ait lieu dans une des copies du gène *lac* est plus importante mais, si elle a lieu, le révertant croît moins vite, en raison du coût énergétique résultant de ses nombreuses copies du gène *lac*. La dernière étape consisterait en la perte des copies qui n'ont pas subi l'événement de réversion et l'obtention d'une souche révertante monocopie pour le gène *lac* et capable de métaboliser le lactose.

3.3.2 Mutant « GASP » *rpoS*

Lors d'une carence nutritive, la croissance bactérienne ralentit jusqu'à son arrêt. Cependant, certaines bactéries mutantes présentent un phénotype de croissance alors qu'une souche sauvage est bloquée en phase stationnaire. Ces mutants ont été appelés « GASP », puisqu'ils présentaient un avantage sensible par rapport à une souche sauvage en phase stationnaire. Le premier mutant « GASP » découvert était muté dans le gène *rpoS*. Cette mutation, nommée *rpoS819*, consistait en la duplication de 46 pb en 3' du gène *rpoS*. Cette mutation de type décalage du cadre de lecture se

traduit d'un point de vue protéique par la synthèse d'un facteur σ^S plus longs de 35 acides aminés par rapport à un facteur σ^S sauvage (Zambrano and Kolter, 1993; Zinser and Kolter, 1999). Cette mutation est de type perte de fonction puisque les 2 gènes σ^S -dépendants *katE* et *bolA* ne sont plus exprimés.

Comment la perte d'un gène essentiel à la réponse au stress, notamment lors de la phase stationnaire, peut-elle conférer un avantage adaptatif ? En fait, des souches mutées dans *rpoS* sont capables, dans certaines conditions environnementales, de mieux croître car elles sont capables de métaboliser un plus grand nombre de substrats et des substrats en quantité très faible (Ferenci, 2003; Saint-Ruf and Matic, 2006). Par exemple, le facteur σ^S exerce une régulation négative sur les gènes codant pour des transporteurs à haute affinité pour le glucose, tels que les gènes *mgl* et *mal*, gènes pourtant nécessaires lors d'une limitation en nutriments (Ferenci, 2001). Une perte de fonction du gène *rpoS* permet donc l'expression de ces transporteurs et l'assimilation des nutriments présents dans le milieu. Cependant, la contrepartie de cet avantage est la baisse de la résistance à de nombreux stress extérieurs. La restauration de la fonction de σ^S , par réversion d'une mutation ponctuelle ou par réacquisition par transfert horizontal d'un gène *rpoS* fonctionnel, peut donc être fortement sélectionnée dans de nombreux environnements (Ferenci, 2003).

Ainsi, dans les populations naturelles d'*E. coli*, une balance est souvent observée entre un gène *rpoS* sauvage et un gène *rpoS* muté et ce gène présente un nombre d'allèles différents très important.

3.3.3 Mutant « GASP » *lrp*

Une souche issue du mutant « GASP » *rpoS* décrit ci-dessus a été isolée. Lorsqu'ils étaient cultivés dans des conditions de compétition, ce mutant était un meilleur compétiteur que le mutant « GASP » *rpoS* dont il descendait. L'analyse moléculaire de cette souche a montré qu'elle présentait 3 mutations en plus de celle affectant le gène *rpoS*. Ces 3 mutations ont été appelées *sgaA*, *sgaB* et *sgaC*. Zinser et Kolter (2000) ont identifié la mutation *sgaB*. Elle se situe dans le gène *lrp* (pour leucine-responsive regulatory protein) et consiste en une délétion de 3 pb provoquant la délétion de la Glycine 39, résidu d'un motif hélice-tour-hélice jouant un rôle capital dans la structuration de la protéine (Platko and Calvo, 1993). Cette mutation provoque une perte de fonction de la protéine Lrp. L'avantage de perdre cette protéine n'est pas encore compris. Cependant, il est intéressant de souligner que les 2 loci affectés chez les mutants « GASP » décrits précédemment, c'est-à-dire *rpoS* et *lrp*, codent des régulateurs de nombreux gènes.

Ainsi, bien que la modification d'une fonction peut augmenter la valeur adaptative d'une cellule, la modification de nombreuses fonctions en même temps, en altérant un régulateur global de ces fonctions, tel que *rpoS* ou *lrp*, pourrait augmenter encore plus la valeur adaptative d'une cellule (Zinser and Kolter, 2000).

3.3.4 Mutant « GASP » *sgaA*

Après la découverte de la nature de la mutation *sgaB*, Zinser *et al.* (2003) ont identifié la nature de la mutation *sgaA*. Des expériences de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont montré que cette mutation consiste en un réarrangement génomique qui va, de façon concomitante, provoquer l'activation d'un locus et l'inactivation d'un autre (Figure 9). Ce réarrangement se serait fait en 2 étapes, la première consistant en l'insertion d'un élément *IS5* entre le promoteur et la boîte CRP du gène *cstA*, codant une perméase, et la seconde en une recombinaison homologue entre cette *IS5* et celle naturellement présente en aval de l'opéron *ybeJ-gltJKL-ybeK*. Cette recombinaison provoque l'inversion du fragment compris entre les 2 copies d'*IS5*, plaçant l'opéron *ybeJ-gltJKL-ybeK* en aval du promoteur de *cstA* et de la boîte CRP. Cet opéron code pour un transporteur putatif d'acides aminés et l'activation de ce locus chez ce mutant pourrait donc conférer un avantage en permettant l'import de certains acides aminés. Le gène *ctsA* code une perméase induite lors d'une carence nutritive (Schultz and Matin, 1991) et pourrait donc conférer un avantage en phase stationnaire en permettant à la cellule de capter les nutriments. L'inactivation de ce gène pourrait ainsi laisser penser à une baisse de la valeur adaptative en phase stationnaire. En fait, les auteurs suggèrent que la perte de la capacité à exploiter une ressource particulière (capacité permise par *CstA*) est largement compensée par la capacité à exploiter d'autres ressources telles que des acides aminés (capacité permise par l'expression de l'opéron *ybeJ-gltJKL-ybeK*) et que ce mutant présente donc un net gain de valeur adaptative (Zinser *et al.*, 2003).

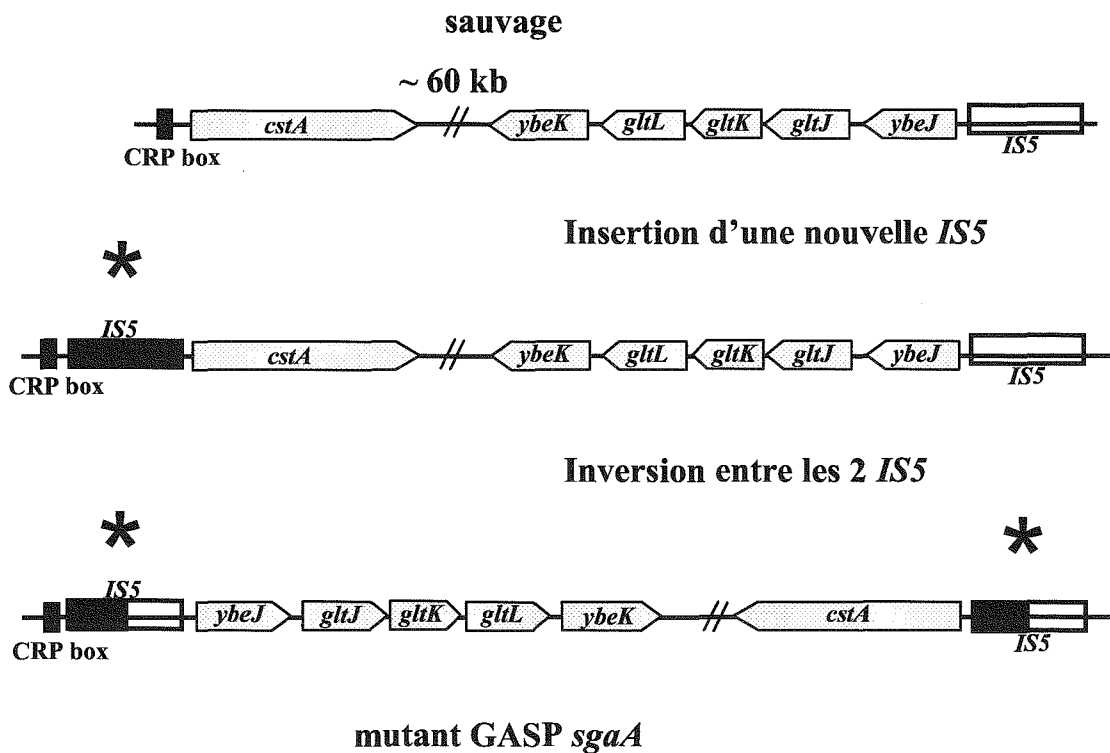


Figure 9 : Le mutant « GASP » *sgaA* est issu d'un réarrangement génomique en 2 étapes, impliquant 2 éléments *IS5*. Chez la souche sauvage, les loci *cstA* et *ybeJ-gltJKL-ybeK* sont espacés de 60 kb environ et transcrits dans des orientations opposées. Le premier réarrangement consiste en l'insertion d'une *IS5* entre le promoteur et la boîte CRP (CRP box) de *cstA*. Le second événement consiste en l'inversion de la séquence entre les 2 *IS5* (d'après Zinser *et al.*, 2003).

Ainsi, en conditions de non croissance, des mutations s'accumulent suite à l'activation, entre autre, de polymérases « error-prone » et des mutations favorables et délétères vont apparaître, conférant respectivement un phénotype « GASP » aux souches mutantes plus compétitives qu'une souche sauvage ou au contraire diminuant la valeur adaptative par rapport à une souche sauvage. Dans des conditions défavorables de croissance, des mutations s'accumulent en permanence, et de nouveaux mutants « GASP », meilleurs que les précédents mutants « GASP » dont ils sont issus apparaissent (Finkel and Kolter, 1999). Ces observations mettent en évidence la dynamique des populations, rendant compte du fait que des mutations favorables dans des conditions particulières de croissance peuvent apparaître. Ce phénomène dynamique aboutit à une diversité des populations bactériennes, diversité permettant la survie si un nouvel environnement vient à être rencontré (Chat *et al.*, 2006; Tenaillon *et al.*, 2001).

3.4 Un exemple de réponse au stress : la réponse stringente

3.4.1 Présentation générale de la réponse stringente

Lors d'une limitation en acides aminés, le nombre d'ARN de transfert non chargés qui se fixent au site A du ribosome augmente et la synthèse protéique est inhibée. Cet événement est le signal de déclenchement de la réponse stringente. Chez *E. coli*, la protéine RelA se lie aux ribosomes ainsi bloqués et, grâce à son interaction avec la protéine ribosomale L11, provoque la synthèse de (p)ppGpp en transférant un phosphate donné par une molécule d'ATP à une molécule de GTP ou GDP (Chatterji and Ojha, 2001; Jain *et al.*, 2006; Wendrich *et al.*, 2002). Une autre voie de synthèse de (p)ppGpp ribosome-indépendante existe *via* la protéine SpoT, qui possède surtout une activité d'hydrolase du (p)ppGpp mais qui peut parfois être responsable de sa synthèse, notamment lors d'une limitation en carbone (Gentry and Cashel, 1996; Hernandez and Bremer, 1991).

Chez de nombreux organismes à coloration Gram positive, comme *Bacillus*, *Streptomyces* ou *Streptococcus*, la réponse stringente existe également mais les activités de synthèse et de dégradation du (p)ppGpp dépendent d'une seule et même protéine (Harris *et al.*, 1998; Martinez-Costa *et al.*, 1998; Mechold *et al.*, 2002; Wendrich and Marahiel, 1997). Cette protéine a été appelée Rel, suivi ou non en indice du nom de l'espèce concernée (par exemple Rel_{Mtb} désigne la (p)ppGpp-synthétase-hydrolase de *Mycobacterium tuberculosis* et Rel_{Seq} celle de *Streptococcus equisimilis*). Il a été montré chez *S. equisimilis* que le caractère bi-fonctionnel de cette protéine était géré grâce à un changement conformationnel permettant de passer de l'état hydrolase OFF/synthétase ON à l'état hydrolase ON/synthétase OFF (Hogg *et al.*, 2004). Récemment, un second membre de la famille des homologues à RelA/SpoT a été identifié chez certaines de ces bactéries, montrant que *rel* ne serait pas le seul gène impliqué dans la synthèse du (p)ppGpp. Ainsi, le gène *rshA* de *S. coelicolor* provoque la synthèse de (p)ppGpp lors d'une limitation en phosphore (Sun *et al.*, 2001).

Une protéine homologue à RelA a été récemment identifiée chez des plantes (Braeken *et al.*, 2006; Givens *et al.*, 2004; van der Biezen *et al.*, 2000).

Le (p)ppGpp va initier un changement global du métabolisme cellulaire dont l'ultime but est l'adaptation aux nouvelles conditions environnementales. Ainsi, il influence la réplication de

l'ADN, la transcription, la recombinaison, la réparation, il induit des changements morphologiques et physiologiques et intervient dans la virulence et la production de métabolites secondaires (Autret *et al.*, 1999; Chatterji and Ojha, 2001; McGlynn and Lloyd, 2000).

3.4.2 Action du (p)ppGpp sur l'expression génique

Chez la majorité des espèces bactériennes, l'ARN polymérase est composée de 6 sous-unités : un dimère de la sous-unité α , qui sert d'échafaudage aux sous-unités β et β' , qui constituent le centre actif de l'enzyme. La sous-unité ω permet la liaison de β' au complexe $\alpha_2\beta$ (Ghosh *et al.*, 2003). Enfin, la sous-unité σ est indispensable à l'initiation de la transcription en formant l'holoenzyme. Le (p)ppGpp est capable de se lier aux sous-unités β et β' de l'ARN polymérase et d'interagir indirectement avec la sous-unité ω , et ainsi de modifier de façon positive ou négative la transcription de nombreux gènes (Magnusson *et al.*, 2005; Toulokhonov *et al.*, 2001; Vrentas *et al.*, 2005). Ainsi, chez *E. coli*, les gènes requis pour la division cellulaire, la formation de l'enveloppe cellulaire, la synthèse d'ARN ribosomaux et de transfert sont réprimés alors que les gènes de biosynthèse et de transport d'acides aminés sont déréprimés (Figure 10). Le (p)ppGpp déstabiliserait les complexes ouverts ARN polymérase/promoteur et réduirait leur durée de $\frac{1}{2}$ vie (Barker *et al.*, 2001b). Ces complexes sont très instables au niveau des promoteurs des gènes d'ARN ribosomaux, ce qui expliquerait l'effet négatif du (p)ppGpp sur leur transcription. Des séquences discriminatoires riches en guanosines, et surtout en cytidines, conduirait le (p)ppGpp à avoir un rôle négatif plutôt que positif (Artsimovitch *et al.*, 2004; Wright, 1997). Ainsi, les séquences en amont des gènes d'ARN ribosomaux sont riches en guanosines et cytidines alors que celles des gènes de biosynthèse d'acides aminés sont riches en adénosines et thymidines. De plus, le (p)ppGpp augmenterait les pauses de l'ARN polymérase lors de l'élongation de la transcription, notamment au niveau des gènes contrôlés négativement (Krohn and Wagner, 1996).

Récemment, un partenaire du (p)ppGpp a été identifié : il s'agit de la protéine DksA. Cette protéine est un facteur de transcription, qui ne se fixe pas à l'ADN mais à l'ARN polymérase au niveau du canal secondaire (Nickels and Hochschild, 2004). Elle permettrait de stabiliser les complexes ARN polymérase/(p)ppGpp (Perederina *et al.*, 2004). De ce fait, elle amplifierait à la fois l'effet négatif du (p)ppGpp sur les promoteurs des ARN ribosomaux, en réduisant la durée de vie des complexes ouverts, et l'effet positif du (p)ppGpp sur les promoteurs des gènes de biosynthèse d'acides aminés (Paul *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2005).

Enfin, un des effets positifs du (p)ppGpp à souligner est son rôle essentiel dans l'activation de *rpoS* et de son régulon. Le (p)ppGpp a une influence positive sur l'élongation de la transcription et

la stabilité du transcrit *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002a; Lange *et al.*, 1995). De plus, il est indispensable à l'expression des gènes *rpoS*-dépendants, puisqu'un mutant incapable de produire du (p)ppGpp n'exprime pas ces gènes, même en présence de forts taux de σ^S (Kvint *et al.*, 2000). Cette activation nécessite la participation de DksA (Brown *et al.*, 2002). Ainsi, le (p)ppGpp, par son action sur le régulon RpoS, constitue un signal de perturbation imminente de croissance et d'entrée en phase stationnaire (Gentry *et al.*, 1993; Teich *et al.*, 1999).

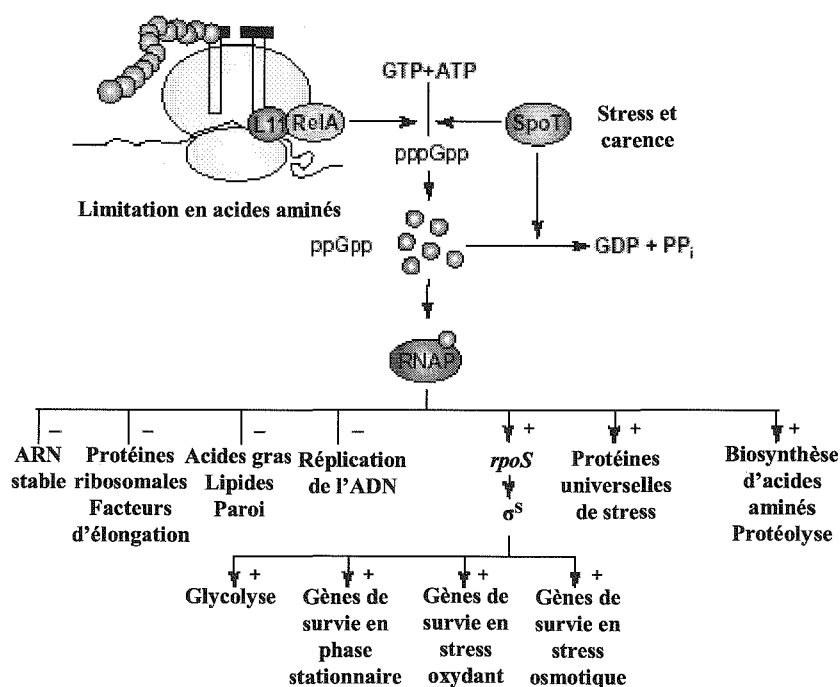


Figure 10 : Le (p)ppGpp est produit par phosphorylation d'un GTP en utilisant un ATP comme donneur de phosphate, grâce à l'intervention de la protéine RelA et de la protéine ribosomique L11 ou par la protéine SpoT, qui possède une activité synthétase ou hydrolase selon les conditions. Le (p)ppGpp se lie à l'ARN polymérase et redirige la transcription vers les gènes de résistance et de survie plutôt que vers les gènes de croissance (d'après Magnusson *et al.*, 2005). L'effet positif (+) ou négatif (-) du (p)ppGpp sur la transcription est indiqué.

3.4.3 Action du (p)ppGpp sur la compétitivité des facteurs σ

Chez *E. coli*, 2 modèles permettent d'expliquer la redirection de la transcription vers des gènes peu transcrits en phase exponentielle de croissance : le premier modèle se base sur l'observation que, *in vitro*, le (p)ppGpp réduit la durée de vie du complexe ouvert ARN polymérase/promoteur au niveau des promoteurs stables, tels que ceux d'ARN ribosomiaux, et que les promoteurs d'acides aminés requièrent une plus forte concentration d'ARN polymérase que les promoteurs d'ARN ribosomiaux pour être transcrits, *in vitro* comme *in vivo* (Barker *et al.*, 2001a).

La déstabilisation des complexes ouverts au niveau des promoteurs stables provoque ainsi l'augmentation du taux d'ARN polymérase libre, ce qui permettrait aux promoteurs qui ont une faible capacité à recruter cette enzyme de bénéficier de l'augmentation de la disponibilité de l'ARN polymérase (Magnusson *et al.*, 2003; Nystrom, 2004). Le deuxième modèle est basé sur la modification de la compétitivité des facteurs σ par le (p)ppGpp : des expériences de compétition *in vitro* et *in vivo* ont montré que les facteurs alternatifs (σ^S , σ^{32} et σ^{54}) étaient plus compétitifs en présence de (p)ppGpp que σ^{70} pour la liaison au « core » de l'ARN polymérase. Ainsi, chez un mutant incapable de produire du (p)ppGpp, le taux de facteurs σ alternatifs liés au « core » de l'ARN polymérase est plus faible que chez une souche sauvage. Des quantifications par western blot ont montré que les concentrations de σ^S et σ^{32} liés au « core » étaient réduites de 70 % par rapport à une souche sauvage (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003). De plus, l'incapacité pour un double mutant *relA spoT* de déclencher la réponse stringente peut être abolie par certaines mutations dans *rpoD* (codant σ^{70}) le rendant moins compétitif pour la liaison au « core » de l'ARN polymérase, ou par la surexpression de Rsd, l'anti- σ^{70} , provoquant une séquestration de σ^{70} . Dans ces cellules, une restauration de l'expression des promoteurs σ^S -dépendants est observée en absence de (p)ppGpp (Hernandez and Cashel, 1995; Jishage *et al.*, 2002).

3.4.4 Réponse stringente et évolution

Des études de réversion chez des souches d'*E. coli* auxotrophes ont permis de mettre en évidence un lien entre (p)ppGpp, augmentation de la transcription et augmentation du taux de mutation. Il a été montré que le taux de réversion des gènes *leuB* et *argH* était plus important chez une souche *relA*⁺ que chez la souche isogénique *relA*⁻ (Wright, 1996). Lors d'une limitation en acides aminés, le (p)ppGpp synthétisé va activer spécifiquement les gènes de biosynthèse d'acides aminés, dont *leuB* et *argH*. Il est envisageable que cette augmentation de la transcription se traduise par l'augmentation de la concentration en ADN simple brin, plus vulnérable aux mutations, d'où une augmentation du taux de réversion des gènes concernés. D'une façon plus générale, la réponse stringente peut être vue comme une réponse modifiant le profil d'expression de nombreux gènes, créant un nouveau profil pour lequel le taux de mutation des gènes est modifié en fonction de leur degré d'expression. L'induction de la réponse stringente permet donc un enrichissement de la population en variants pour les gènes surtranscrits, donc la création d'un polymorphisme génétique (Wright, 1997; Wright *et al.*, 1999).

3.4.5 Réponse stringente et réplication

Un lien a été établi entre réponse stringente et inhibition de la réplication chez *E. coli* et *B. subtilis* (Levine *et al.*, 1991). Alors que chez *E. coli*, l'initiation de la réplication est bloquée au niveau d'oriC, chez *B. subtilis*, le blocage se fait approximativement à 200 kb d'oriC, c'est-à-dire après que 10 % environ du chromosome a été répliqué. Ce blocage se fait au niveau de sites nommés LSTer et RSTer (pour Left ou Right Stringent Terminators) et requiert la présence de (p)ppGpp et de la protéine RTP, équivalent fonctionnel de la protéine Tus chez *E. coli*, normalement active au terminus de la réplication (Autret *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 1995).

Il a également été proposé que le (p)ppGpp, en déstabilisant les complexes ouverts ARN polymérase/ADN, ait une influence sur la réplication de l'ADN. En effet, les ARN polymérases bloquées au niveau d'une lésion de l'ADN provoquent à la fois des problèmes dans la réparation par excision de la lésion et dans la progression de la fourche de réplication. Le (p)ppGpp, en déstabilisant les complexes ouverts, permet de réduire le nombre d'ARN polymérases bloquées au niveau de lésions, levant le blocage de la fourche de réplication, et favorise également la réparation des lésions (McGlynn and Lloyd, 2000; Trautinger *et al.*, 2005).

3.4.6 La réponse stringente comme stratégie de survie

La survie des bactéries lors d'une modification de l'environnement nécessite la mise en place de processus moléculaires tels que le passage par une phase de non croissance, une différenciation morphologique (sporulation), la formation d'un biofilm ou l'établissement de quorum-sensing. De nombreux exemples démontrent que la réponse stringente est requise dans ces phénomènes biologiques, que ce soit chez des bactéries pathogènes ou non pathogènes.

Ainsi, chez *S. typhimurium*, le (p)ppGpp induit l'expression de nombreux îlots de pathogénicité et de gènes de virulence et une souche incapable de synthétiser du (p)ppGpp est avirulente (Pizarro-Cerda and Tedin, 2004; Song *et al.*, 2004). De même, chez *Vibrio cholerae*, bactérie pathogène retrouvé dans le lumen intestinal d'un homme infecté, les 2 principaux facteurs de virulence CT (pour Cholera Toxin) et TCP (pour Toxin Coregulated Pilus) sont également régulés positivement par le (p)ppGpp, vraisemblablement *via* la régulation de leur activateur transcriptionnel ToxR (Haralalka *et al.*, 2003). *Mycobacterium tuberculosis* est capable de rester en « état dormant » plusieurs années dans l'organisme humain, sans apparition de symptômes. On

estime à 1/3 la population humaine infectée de façon latente par cette bactérie. Il a été montré que le (p)ppGpp intervient dans ce processus de survie à long-terme (Dahl *et al.*, 2003; Primm *et al.*, 2000). *Legionella pneumophila* est un parasite des amibes. Lors d'un stress nutritif, le (p)ppGpp permet à cette bactérie d'exprimer ses gènes de virulence, d'échapper à son hôte, de survivre et de se disperser dans l'environnement jusqu'à ce qu'elle retrouve une niche favorable (Hammer and Swanson, 1999). Enfin, le processus d'infection par *Pseudomonas aeruginosa* nécessite la mise en place d'un quorum-sensing grâce à 2 acylhomosérine lactones. La protéine RelA contribue à la pathogénicité en agissant sur l'établissement de ce quorum-sensing (Erickson *et al.*, 2004; van Delden *et al.*, 2001).

Le mode de vie de certaines populations bactériennes dans des environnements particuliers peut favoriser la formation de structures multicellulaires organisées telles que les biofilms, qui peuvent constituer une stratégie de survie dans certaines conditions. Par exemple, lorsqu'une limitation nutritionnelle est détectée, les cellules d'*E. coli*, comme celles de *P. aeruginosa*, peuvent former un biofilm, structure hautement organisée, comprenant des microcolonies et des canaux, à travers lesquels le milieu est libre de circuler, permettant ainsi l'accès aux nutriments et l'évacuation des déchets (Reisner *et al.*, 2003). Dans ces structures, le taux de croissance est plus faible qu'en culture liquide mais la résistance aux antibiotiques est fortement accrue. Les cellules au centre des microcolonies présentent un taux de croissance quasiment nul par rapport aux cellules en périphérie de la microcolonie mais une résistance beaucoup plus importante à des agents antibactériens, assurant une pérennité de la structure dans des conditions fortement défavorables (Sternberg *et al.*, 1999). Le développement, la virulence, et donc la survie de *Streptococcus mutans* ou *Listeria monocytogenes*, responsables respectivement des caries et de septicémies d'origine digestive chez l'Homme, nécessitent l'établissement d'un biofilm, formation RelA-dépendante (Lemos *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2002). Ce processus de survie à un stress nutritif est donc dépendant de la réponse stringente (Balzer and McLean, 2002).

Certaines bactéries réagissent à un stress nutritif en déclenchant un programme de développement morphologique particulier, permettant la survie de l'espèce. Chez *Myxococcus xanthus*, le choix entre croissance et déclenchement du processus de fructification dépend principalement de 2 protéines à effet opposé : CsgA (qui intervient dans la formation du corps de fructification, durant lequel environ 100 000 cellules s'agrègent) et SocE (qui privilégie la croissance) (Figure 11). Le (p)ppGpp inhibe la transcription du gène *socE* et active celle du gène *csgA*, modifiant le ratio CsgA/SocE et déclenchant donc le programme de formation du corps de

fructification (Crawford and Shimkets, 2000). Le (p)ppGpp active également l'expression du facteur A, indispensable au déclenchement du processus de fructification (Harris *et al.*, 1998).

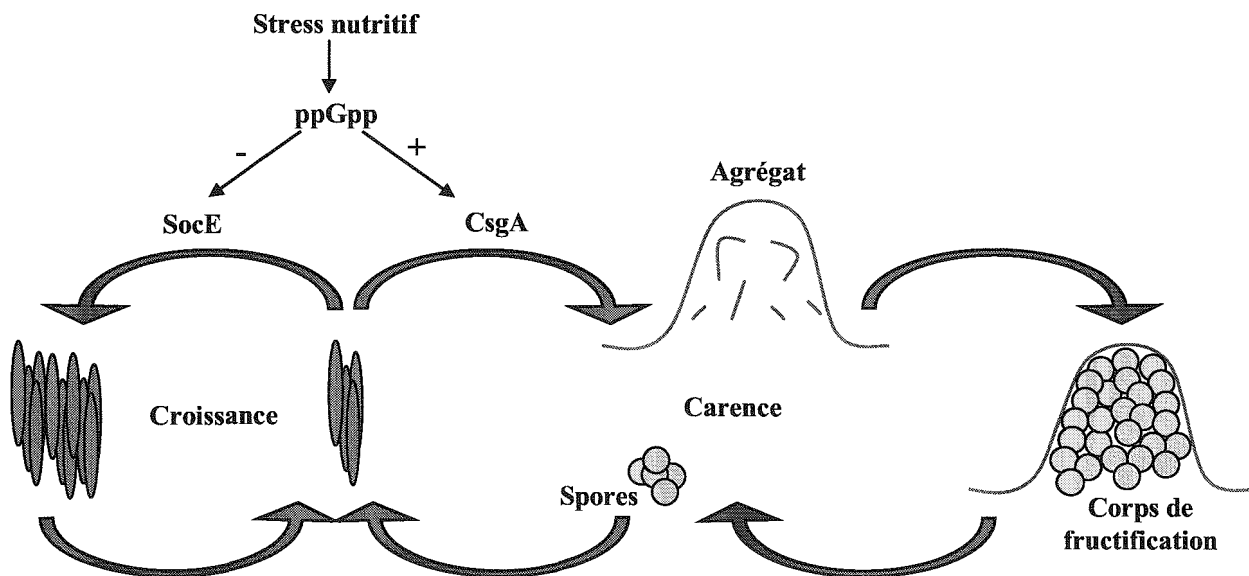


Figure 11 : Le comportement social de *M. xanthus* se manifeste par la formation de 2 structures différentes : en absence de (p)ppGpp, SocE conduit à un regroupement de cellules en croissance, nécessitant des interactions cellule-cellule, alors que lorsque la densité cellulaire est forte et que les cellules sont limitées en nutriments, CsgA conduit à l'agrégation des cellules et à la formation d'un corps de fructification multicellulaire. Lorsque la phase de carence est achevée, les spores sont disséminées du corps de fructification et germent (d'après Kaplan, 2003 et Crawford and Shimkets, 2000).

Le processus de sporulation de *B. subtilis* est également dépendant de la réponse stringente. Un mutant *relA*⁻ de *B. subtilis* incapable de produire du (p)ppGpp ne forme pas de spores (Ochi *et al.*, 1981).

Enfin, la réponse stringente intervient dans le processus de mort cellulaire programmée (ou PCD pour Programmed Cell Death). Chez *E. coli*, les gènes *relA*, *mazE* et *mazF* constituent un opéron. MazF est une toxine très stable et MazE est une protéine labile, qui protège la cellule de l'effet toxique de MazF. Lors d'une limitation nutritionnelle, le (p)ppGpp produit va inhiber la transcription de *mazE* et *mazF*. MazF étant beaucoup plus stable que MazE, la concentration intracellulaire de l'anti-toxine va baisser beaucoup plus rapidement que celle de la toxine MazF, conduisant à la mort de la cellule (Aizenman *et al.*, 1996). Les auteurs ont proposé que la mort d'une partie de la population pourrait servir à la survie de l'autre partie, par exemple par relargage de nutriments lors de la lyse des cellules. La mort cellulaire programmée pourrait donc être un

processus indispensable à la survie, non pas de l'individu en tant que tel, mais de la population ou de l'espèce à laquelle il appartient. L'hypothèse du « suicide » d'une partie de la population est corroborée par le fait que la majorité des processus précédemment cités et qui dépendent de la réponse stringente s'accompagne d'un phénomène de mort cellulaire : chez *B. subtilis*, le processus de sporulation s'achève par la lyse de la cellule mère, lyse qui permet non seulement de libérer l'endospore, mais qui pourrait également permettre d'apporter des nutriments nécessaires à la germination de celle-ci (Lewis, 2000). Chez *M. xanthus*, la production de substances telles que la glucosamine est requise pour la bonne formation du corps de fructification et la sporulation. Ces substances provoquent la lyse d'une partie (65 à 90 %) des cellules végétatives, ce qui pourrait, comme chez *B. subtilis*, permettre le relargage de nutriments qui seraient utilisés pour la formation du corps de fructification et des myxospores (Dworkin, 2000; Lewis, 2000). Enfin, lors de l'établissement d'un biofilm chez *P. aeruginosa*, des événements de mort cellulaire conduisent à la bonne organisation spatio-temporelle du biofilm (Webb *et al.*, 2003).

4 *Streptomyces* : un modèle d'étude de l'instabilité génétique

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses non pathogènes du sol, appartenant à la famille des Actinomycètes, bactéries à coloration Gram positive et à haut pourcentage en bases GC.

4.1 Différenciation morphologique et physiologique des *Streptomyces*

4.1.1 Cycle de différenciation

Le cycle de différenciation morphologique des *Streptomyces* est complexe et aboutit à un organisme bien différencié : sur milieu gélosé, à partir d'une spore naît un mycélium végétatif à croissance radiale, qui rampe sur la gélose. Ce mycélium est composé d'hyphes ramifiés et multigénomiques. Après 3 jours de croissance, un mycélium aérien s'érige en utilisant comme substrat le mycélium végétatif. Ce mycélium aérien est lui composé d'hyphes non ramifiés et multigénomiques. Enfin, après 4 à 5 jours de croissance, les filaments du mycélium aérien subissent une septation, ce qui donne naissance à des chaînettes de spores unigénomiques. Ces spores sont ensuite disséminées et un nouveau cycle recommence (Chater, 1998).

4.1.2 Différenciation physiologique

Il semble exister un lien entre habitat naturel, taille du génome et complexité du métabolisme. En effet, alors que l'analyse des génomes de *Mycoplasma genitalium*, de *Lactococcus lactis* et d'*E. coli*, 3 bactéries dont l'habitat est peu variable et la taille du génome inférieure à 4,7 Mb, révèle la présence respective de 1, 2 et 7 facteurs σ , le génome de *S. coelicolor* en comporte 66 (Lee *et al.*, 2005). De plus, il a été observé que le nombre de protéines de régulation et de systèmes à 2 composants était directement proportionnel à la taille du génome. Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, dont la taille du génome est de 6,3 Mb, plus de 500 gènes interviennent dans les voies de régulation alors que *M. genitalium*, dont la taille n'excède pas 0,6 Mb, ne possède pas de protéines régulatrices (sauf un facteur σ) ni de systèmes à 2 composants (Koonin *et al.*, 1996; Stover *et al.*, 2000). Chez *S. coelicolor*, de nombreux systèmes de transduction de signal à deux composants, intervenant dans la régulation transcriptionnelle, ont été identifiés (Hutchings *et al.*, 2004). Cette multitude de régulateurs de l'expression génique, intervenant dans de nombreuses cascades de régulation, rend compte du métabolisme complexe de cette bactérie, qui peut être expliqué par son habitat. En effet, le sol est non seulement un milieu très variable d'un point de vue chimique et physique (pH, température, nutriments, ...) mais comporte également de nombreuses communautés microbiennes pouvant interagir ou entrer en compétition avec *Streptomyces*. Une forte pression de sélection a ainsi été exercée sur la présence de voies de régulation fine du métabolisme et de résistance. Les *Streptomyces* présentent un des plus grands génomes bactériens (entre 8 et 10 Mb). La complexité de sa niche écologique a conduit à la sélection de voies métaboliques complexes, ce qui pourrait également expliquer la taille importante de son chromosome.

Ce métabolisme complexe se traduit notamment par la production d'un très grand nombre de métabolites secondaires d'intérêt industriel : les *Streptomyces* produisent par exemple plus de 60 % des antibiotiques utilisés en industrie pharmaceutique. Les molécules produites intéressent également les industries agricoles (production d'herbicides, d'insecticides, d'antifongiques), pharmaceutiques (production d'immunosuppresseurs, d'anticancéreux, d'anabolisants) ou cosmétiques (production de pigments) (Bibb, 1996; Thompson *et al.*, 2002). La production de ces molécules non essentielles à la survie de la bactérie, du moins en conditions de laboratoire, coïncide avec le passage du mycélium végétatif au mycélium aérien.

4.2 Identification de mutants bloqués dans la différenciation morphologique

La caractérisation de mutants de *S. coelicolor* affectés dans la différenciation morphologique a permis de mettre en évidence 2 classes de gènes : les gènes *bld* (pour bald) et les gènes *whi* (pour white).

4.2.1 Les mutants *bld*

Les gènes *bld* (tableau 2) sont des gènes dont la mutation provoque une absence de production de mycélium aérien. Ce blocage est dû à l'incapacité de ces mutants à produire SapB, peptide de surface sécrété, indispensable à la croissance du mycélium aérien (Chater, 1993; Nodwell *et al.*, 1999; Willey *et al.*, 1993).

Tableau 2 : Liste des gènes *bld* identifiés. Les fonctions associées sont indiquées.

Gène	Fonction associée	Référence
<i>bldJ</i> (<i>bld261</i>)	1er signal extracellulaire	Nodwell <i>et al.</i> , 1996
<i>bldK</i>	Transporteur ABC	Nodwell <i>et al.</i> , 1996
<i>bldA</i>	ARN de transfert qui reconnaît les codons rares UUA	Kim <i>et al.</i> , 2005
<i>bldH</i>	Régulé par BldA car contient un codon TTA Contribue, avec BldA, au 2ème signal extracellulaire	Takano <i>et al.</i> , 2003
<i>bldG</i>	Facteur anti-anti- σ	Bignell <i>et al.</i> , 2000
<i>bldC</i>	Activateur transcriptionnel de la famille MerR	Hunt <i>et al.</i> , 2005
<i>bldD</i>	Protéine de liaison à l'ADN. Régule négativement <i>whiG</i> , <i>sigF</i> , <i>bldN</i> , <i>bdtA</i> et sa propre transcription	Bibb <i>et al.</i> , 2000 Elliot <i>et al.</i> , 2001
<i>bldM</i>	Régulateur à 2 composants de la famille FixJ	Molle and Buttner, 2000

Alors que l'observation des fonctions de ces gènes ne permet pas de dégager clairement une cascade de régulation, des expériences de complémentation unidirectionnelle des mutants *bld* ont permis d'établir une classification des gènes dans la cascade de signaux extracellulaires aboutissant

à la morphogénèse du mycélium aérien (Figure 12) (Kelemen and Buttner, 1998). Par exemple, quand un mutant *bldK* était cultivé à proximité d'un mutant *bldJ*, un liseré gris apparaissait sur le mutant *bldJ* mais pas sur le mutant *bldK*, montrant que le gène *bldK* intervient après *bldJ* dans la cascade de différenciation.

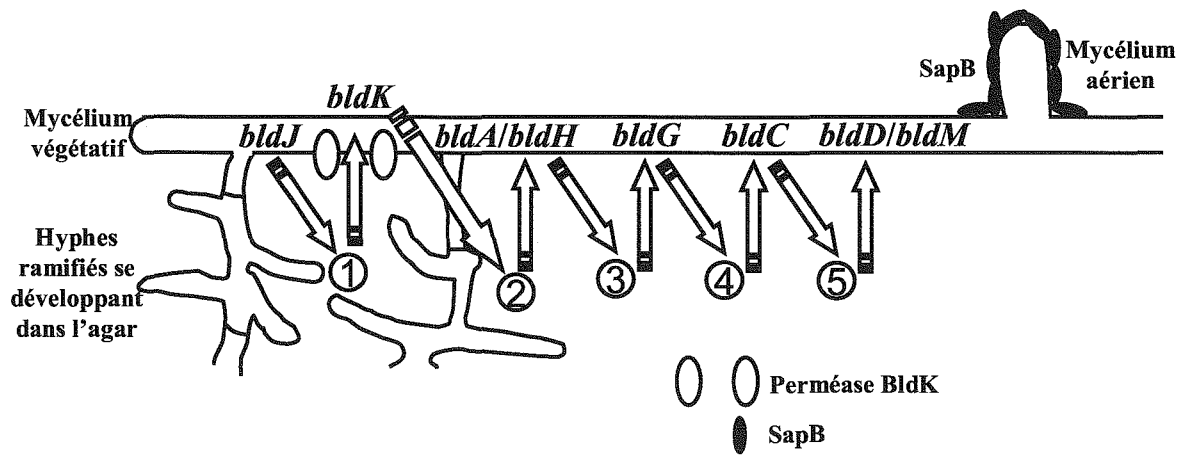


Figure 12 : Schéma indiquant la cascade d'expression des gènes *bld* conduisant à la production de la protéine SapB. Le signal 1, produit par le gène *bldJ*, s'accumule de façon extracellulaire puis est importé par la perméase BldK, ce qui provoque la synthèse du signal 2 qui est exporté puis provoque la synthèse du signal 3 grâce à l'intervention de *bldA* et *bldH*. Le signal 3 est relargué et provoque la synthèse via *bldG* puis le relargage du signal 4 qui provoque la synthèse puis le relargage d'un dernier signal, le signal 5. Ce signal provoque la production de SapB et l'érection du mycélium aérien (d'après Nodwell *et al.*, 1996 et Kelemen and Buttner, 1998).

4.2.2 Les mutants *whi*

4.2.2.1 Présentation générale des gènes *whi*

Les gènes *whi* sont des gènes dont la mutation empêche la formation de spores matures malgré la présence d'un mycélium aérien développé. Il existe deux types de gènes *whi*, dits précoces (tels que *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* et *whiJ*), qui jouent un rôle dans les premières étapes du processus de sporulation lors de la septation des hyphes aériens, et les gènes dits tardifs (tels que *sigF*, *whiD*, *whiE*, *whiL*, *whiM* et *whiO*) qui interviennent dans la maturation des spores. La fonction exacte de *whiA*, *whiJ*, *whiO*, *whiM*, et *whiL* reste encore inconnue.

Un phénotype mutant a été associé à la mutation dans chacun des gènes *whi* identifiés (Figure 13). Ainsi, une mutation dans les gènes *whiG* ou *whiH*, qui font partie des gènes précoces, n'aura pas le même impact morphologique qu'une mutation dans les gènes *whiD* ou *whiE*, qui font partie des gènes tardifs : par exemple, un mutant *whiG* présente des hyphes aériens droits sans traces de

septation de spores alors qu'un mutant dans *whiD* présente des chaînettes de spores enroulées et différenciées se rapprochant fortement de ce qui est observé chez une souche sauvage.

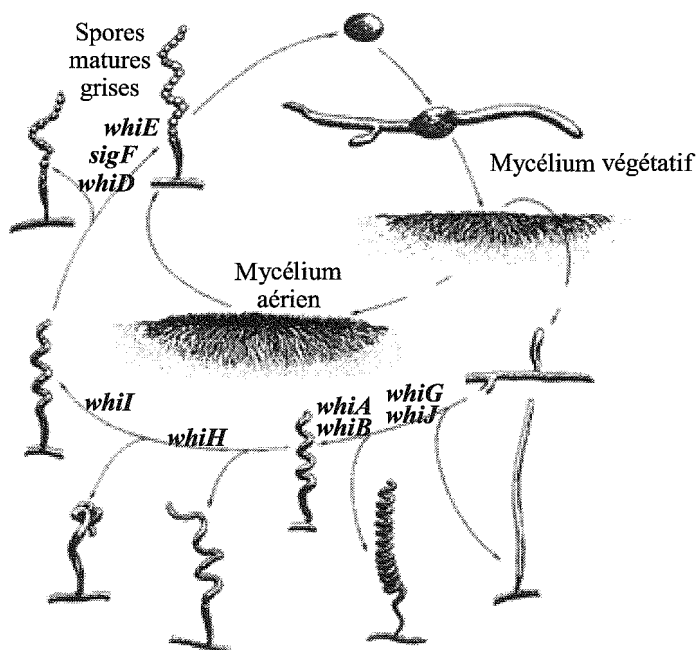


Figure 13 : Représentation de la métamorphose progressive d'un hyphes aérien en chaîne de spores. Le moment où les différents gènes *whi* sont actifs est indiqué (d'après Chater *et al.*, 1998).

Des essais de complémentation ont permis de mettre en évidence que les gènes *whi*, comme les gènes *bld*, sont organisés en cascade de régulation (Figure 14).

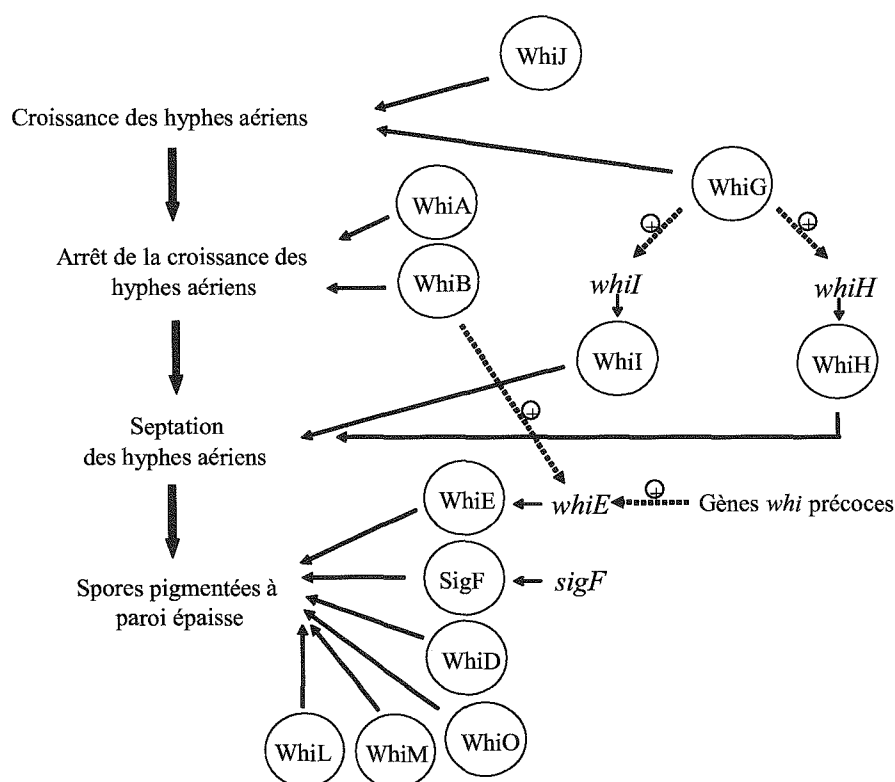


Figure 14 : Représentation de l'enchaînement temporel des protéines Whi de fonction connue au cours de la formation des spores. Les $\oplus$ indiquent les protéines régulant positivement certains gènes. WhiG deviendrait actif lors de la croissance des hyphes aériens, ce qui permettrait la transcription de *whiH* et *whiI*. Les protéines WhiA et WhiB pourraient être converties en formes actives lors d'une réduction de croissance du mycélium aérien, ce qui permettrait de coordonner l'arrêt de la croissance. Cet arrêt pourrait être un signal qui modifierait la conformation des protéines WhiH et WhiI, qui perdraient leur activité d'autorépresseurs et activeraient le processus de septation. A ce moment là, les protéines tardives, comme *whiE*, *whiD* et *sigF* activent la maturation des spores (d'après Chater, 2001).

4.2.2.2 Le gène *whiG*

Le gène *whiG* code un facteur σ -alternatif de 280 acides aminés, similaire à σ^D de *B. subtilis* et à σ^F des bactéries coliformes (Arnosti and Chamberlin, 1989; Ohnishi *et al.*, 1990). Des homologues à σ^{whiG} existent dans d'autres espèces de *Streptomyces* comme *S. avermitilis*, *S. griseocarnum*, *S. aureofaciens* montrant son rôle important dans le développement (Kormanec *et al.*, 1994; Omura *et al.*, 2001; Soliveri *et al.*, 1993). Les facteurs σ^{whiG} , σ^D et σ^F appartiennent à la grande famille des facteurs σ^{70} et à la sous-famille des facteurs σ -alternatifs. La famille des facteurs σ^{70} se caractérise par 4 grandes régions relativement bien conservées, notamment les régions 2.4 et 4.2. La région 2.4 est impliquée dans la reconnaissance de la boîte -10 des promoteurs régulés par ces facteurs σ et la région 4.2 dans celle de la boîte -35 (Wosten, 1998).

Trois gènes cibles de σ^{whiG} ont été identifiés chez *S. coelicolor*. Il s'agit de *whiH*, *whiI* et d'un gène codant une protéine ProX-like intervenant dans la réponse au stress osmotique (Ainsa *et al.*, 1999; Ryding *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1998).

La régulation de *whiG* et de σ^{whiG} est encore peu connue (Chater, 2001). En effet, alors que le facteur σ^{whiG} ne semble être actif qu'à partir de la mise en place du processus de sporulation, des expériences de protection à la nucléase S1 ont montré qu'un transcrit *whiG* était détecté à un taux relativement constant tout au long des stades du développement (Elliot *et al.*, 2001; Kelemen *et al.*, 1996). Un facteur anti- σ^{whiG} pourrait être responsable de cette activation temporelle. Le facteur σ^{whiG} est très homologue au facteur σ^{FlaA} de *S. typhimurium* dont l'anti- σ est FlgM (Chater, 2001; Ohnishi *et al.*, 1990). Cependant, l'analyse du génome de *S. coelicolor* ne révèle aucun homologue à FlgM.

D'autre part, il a récemment été mis en évidence qu'un des gènes *bld*, *bldD*, codait une protéine se liant à l'ADN et réprimant entre autres gènes le gène *whiG* (Elliot *et al.*, 2001). Ceci pourrait expliquer la régulation temporelle de l'expression de *whiG*.

D'un point de vue phénotypique, un mutant *whiG* présente des longs hyphes aériens droits dépourvus de spores et de pigmentation grise contenant de l'ADN sous forme décondensée tout au long des hyphes aériens (Flardh *et al.*, 1999).

4.2.2.3 Le gène *whiH*

Ce gène code un répresseur transcriptionnel de 295 acides aminés de la famille GntR, famille décrite en premier chez *B. subtilis* (Fujita *et al.*, 1986; Haydon and Guest, 1991). Les répresseurs GntR sont divisés en 4 sous-familles : FadR, HutC, MocR et YtrA (Rigali *et al.*, 2002). WhiH appartient à la sous-famille FadR, sous-famille la plus représentée (40 %). Ces répresseurs présentent un motif HTH permettant la liaison à l'ADN et la majorité serait active sous forme de dimère.

Les gènes cibles de WhiH n'ont pas encore été identifiés. Cependant, WhiH inhiberait sa propre transcription puisqu'un mutant inactif dans *whiH* présente une surproduction de l'ARN messager *whiH* (Ryding *et al.*, 1998). La transcription de *whiH* est régulée temporellement au cours du développement et un taux maximal de transcrit est détecté lors de l'apparition des premières spores, ce qui coïncide avec l'initiation de la transcription de *sigF*. La transcription de *whiH* est σ^{whiG} -dépendante et il a été montré qu'un mutant ne produisant pas de σ^{whiG} fonctionnel ne présentait pas de transcrit pour *whiH* (Ryding *et al.*, 1998). Enfin, *whiH* pourrait être régulé, comme le sont souvent les répresseurs de la famille GntR, par un métabolite spécifique, dont la

concentration change au cours du développement. Ainsi, la protéine FadR chez *E. coli* semble être induite en réponse à une accumulation transitoire de longues chaînes d'acétyl-CoA suite à un arrêt de la croissance (DiRusso and Nystrom, 1998). WhiH pourrait ainsi permettre la transmission d'information sur l'état physiologique des hyphes aériens à la machinerie transcriptionnelle des gènes de sporulation (Ryding *et al.*, 1998).

D'un point de vue phénotypique, le mutant *whiH* présente des hyphes aériens légèrement enroulés et divisés en fragments de taille variable. Ces hyphes contiennent de l'ADN condensé mais les nucléoïdes sont positionnés de façon aberrante (Flardh *et al.*, 1999). Contrairement aux mutants *whiA*, *whiB* et *whiG*, le mutant *whiH* présente une légère pigmentation grise, montrant que le gène *whiE* n'est pas totalement inactif (cf. paragraphe 4.2.2.7).

4.2.2.4 Le gène *whiI*

Le gène *whiI* code un « response-regulator » atypique de système à deux composants (Ainsa *et al.*, 1999). En effet, ce « response-regulator » présente 2 particularités qui le différencie des « response-regulators » habituellement décrits : il n'est pas associé à une « serine-kinase » juste en aval et il lui manque au moins 2 des résidus très conservés dans la poche de phosphorylation. La transcription de *whiI* est contrôlée de façon temporelle spécifiquement par le facteur σ^{WhiG} et elle atteint un maximum au moment de la formation des spores. Un mutant nul *whiI* présente des transcrits *whiH* et *whiI* précoces et plus fortement présents et persistants qu'une souche sauvage suggérant que le gène *whiI* réprimerait sa propre transcription ainsi que celle du gène *whiH*.

D'un point de vue phénotypique, le mutant nul *whiI* présente des hyphes aériens de longueurs similaires à ceux observés chez une souche sauvage, mais peu enroulés, dépourvus de spores et contenant de l'ADN sous forme décondensée tout au long des hyphes aériens, comme chez les mutants *whiA*, *whiB* et *whiG*.

4.2.2.5 Le gène *whiA*

La fonction précise de ce gène n'a pas encore été bien déterminée malgré son caractère ubiquitaire dans le groupe des bactéries à coloration Gram positive. Il appartient à un cluster de 4 gènes, dont 3 codent des protéines de fonction inconnue et un code UvrC. La conservation parfaite de l'organisation des gènes chez les mycobactéries et quasi-parfaite (3 gènes sur 4) chez l'ensemble des bactéries à coloration Gram positive, à l'exception des mycoplasmes, suggère que ces 4 gènes

pourraient être co-régulés. Un transcrit *whiA* est détecté à tous les stades du développement mais il a été proposé que WhiA soit sous forme inactive dans le mycélium végétatif. Ce gène présente 2 promoteurs, un permettant une transcription faible et constitutive, l'autre une transcription forte et contrôlée par le stade de développement. Malgré le fait que *whiA* semble s'auto-activer et activer d'autres gènes, des homologues avec des facteurs de transcription n'ont pas été révélés. WhiA pourrait activer un activateur transcriptionnel ou inactiver un répresseur (Ainsa *et al.*, 2000).

D'un point de vue phénotypique, le mutant *whiA*, comme le mutant *whiB*, présente des hyphes aériens étroitement enroulés, plus longs qu'une souche sauvage, qui contiennent de l'ADN décondensé et qui ne présentent aucune trace de septation.

Il a été proposé que WhiA et WhiB pourraient être responsables de la décision de stopper la croissance des hyphes aériens avant d'entamer le processus de septation, par exemple en réponse à une baisse graduelle de la quantité d'un composé (Flardh *et al.*, 1999).

4.2.2.6 Le gène *whiB*

Le gène *whiB* code une petite protéine (87 acides aminés) qui se lierait à l'ADN. La présence de 4 résidus cystéine, très fortement conservés dans des gènes codant de petites protéines de liaison à l'ADN au sein des Actinomycètes, suggère que WhiB pourrait répondre à un changement rédox, par la formation de ponts disulfure. Il a ainsi été proposé que WhiB pourrait détecter un stress oxydant transitoire causé par le ralentissement de la croissance d'une colonie et permettre, avec WhiA, de modifier l'expression de gènes intervenant dans la différenciation morphologique (Chater, 2001). La transcription de *whiB* dépend de 2 promoteurs, l'un actif faiblement et de façon constitutive, l'autre induit d'un facteur 25 lorsque les hyphes aériens apparaissent (Soliveri *et al.*, 1992).

D'un point de vue phénotypique, le mutant *whiB* présente, comme le mutant *whiA*, des hyphes aériens plus longs qu'une souche sauvage, étroitement enroulés, sans septum et qui contiennent de l'ADN sous forme décondensée (Flardh *et al.*, 1999).

4.2.2.7 Le gène *whiE*

Ce locus complexe code des protéines qui ressemblent à celles codées au niveau des loci de polycétone synthétases de type II impliquées dans la synthèse de nombreux antibiotiques aromatiques. Ce locus est responsable de la pigmentation grise des spores (Davis and Chater, 1990).

La transcription de ce locus de 8 gènes est assurée par 2 promoteurs, orientés différemment, dont l'un est responsable de la transcription de 7 gènes en opéron (ORFI à ORFVII), et l'autre de celle de ORFVIII (Kelemen *et al.*, 1998). La transcription à partir des 2 promoteurs dépend des 6 gènes précoces : un mutant *whiA*, *whiB*, *whiG* ou *whiI* ne présente pas de transcrit *whiE* et des spores blanches alors qu'un mutant *whiH* ou *whiJ* présente 10 fois moins de transcrit *whiE* qu'une souche sauvage et des spores gris pâle. Le second promoteur de *whiE* est également contrôlé par le facteur *sigF*. Ce contrôle temporel se manifeste par la détection d'un transcrit *whiE* uniquement entre 72 h et 96 h de croissance sur milieu solide (Kelemen *et al.*, 1998).

4.2.2.8 Le gène *sigF*

Le gène *sigF* code un facteur σ intervenant dans les dernières étapes de la cascade de sporulation. Un mutant *sigF* présente des spores peu pigmentées, plus petites et déformées que des spores sauvages. Leur paroi est plus mince et plus sensible au détergent et l'ADN n'est pas sous forme condensée (Potuckova *et al.*, 1995). La transcription de *sigF* est fonction du stade de développement : un transcrit n'est observé qu'entre 72 et 96 h de croissance, ce qui correspond à la formation des septa de sporulation (Kelemen *et al.*, 1996). Ce gène ne s'auto-régule pas mais il est un des gènes cibles de la protéine BldD (Elliot *et al.*, 2001).

4.2.2.9 Le gène *whiD*

La protéine WhiD appartient à la famille des facteurs transcriptionnels putatifs WhiB-like, présents chez les Actinomycètes mais absents des autres groupes (Soliveri *et al.*, 2000). Elle est capable de lier les centres [4Fe-4S] (Jakimowicz *et al.*, 2005). Sa transcription dépend de 2 promoteurs, tous les 2 régulés en fonction du stade de développement : la transcription est détectée dans les colonies à partir de 72 heures de cultures, temps qui correspond à la formation des septa. Un transcrit est détecté à 96 h mais plus 120 h, c'est-à-dire une fois le processus de sporulation achevé (Molle *et al.*, 2000). Le gène *whiD* est ainsi placé dans les gènes tardifs. Un mutant *whiD* produit des spores présentant des caractéristiques différentes de celles d'une souche sauvage : elles sont sensibles à la chaleur, prédisposées à la lyse et de taille irrégulière vraisemblablement à cause d'une mauvaise disposition du septum. De plus, des septa additionnels se forment par épaissement de la paroi cellulaire, provoquant l'apparition de « mini-compartiments » dépourvus d'ADN chromosomique. Ces « mini-compartiments » vont ensuite être lysés et constituer des

spores « fantômes ».

4.3 *Streptomyces* est caractérisé par une forte instabilité génétique

Les *Streptomyces* se caractérisent par une forte instabilité génétique et chromosomique.

L'instabilité génétique affecte certains gènes, qui diffèrent entre les espèces. Les caractères communément affectés sont la résistance et la production d'antibiotiques, la sporulation, la pigmentation ou la morphologie des colonies. Par exemple, chez *S. rimosus*, 80 % des colonies issues d'un étalement de spores sont des variants : ils sont hétérogènes, plus ou moins affectés dans la sporulation, la pigmentation, la morphologie, la résistance et la production d'oxytétracycline (Petkovic *et al.*, 2006). Les souches sauvages de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont pigmentées grises. L'instabilité génétique chez ces espèces se manifeste par exemple d'un point de vue phénotypique par la production dans la descendance d'une colonie sauvage, de colonies totalement ou partiellement (sous forme de secteurs ou de papilles) dépigmentées. Ces colonies mutantes ont été interprétées comme le résultat d'un événement mutationnel survenu à un stade précis du développement. Ainsi, les secteurs dépigmentés seraient issus d'une mutation lors de la formation du mycélium végétatif, les papilles dépigmentées lors de la formation du mycélium aérien et les colonies dépigmentées lors de la formation de la spore mature) (Figure 15).

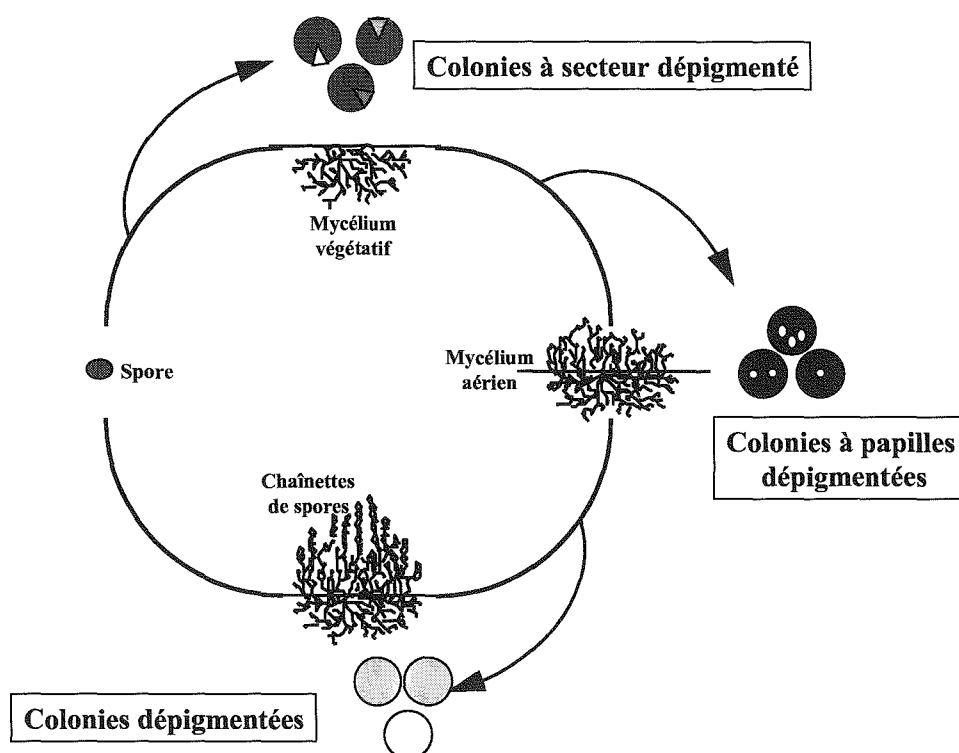


Figure 15 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle de développement de *S. ambifaciens* et des types mutants observés (d'après Dary *et al.*, 2000).

Les *Streptomyces* font partie des rares bactéries présentant un chromosome linéaire (Leblond *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993). De plus, ce chromosome présente une des tailles les plus importantes parmi les génomes bactériens séquencés (de 8 à 10 Mb environ selon les espèces pour environ 8000 gènes), taille rendant compte de la complexité du métabolisme de cet organisme (Borodina *et al.*, 2005). La structure chromosomique est caractérisée par la présence de séquences terminales inversées, appelées TIR (pour Terminal Inverted Repeats), associées de manière covalente à des protéines permettant, entre autre, la protection des extrémités chromosomiques de l'action d'exonucléases (Chen, 1996). Enfin, une origine de réplication située approximativement au centre du chromosome et fonctionnant de manière bidirectionnelle définit les 2 bras chromosomiques (Fischer *et al.*, 1998).

L'instabilité génétique observée chez *Streptomyces* est souvent corrélée à une instabilité chromosomique consistant en l'apparition de réarrangements génomiques de grande taille dans les descendants d'une souche sauvage ((Dary *et al.*, 1999; Leblond and Decaris, 1999). Par exemple, les colonies Pig⁻sec (issues d'un secteur dépigmenté) et Pig⁻col (issues d'une colonie dépigmentée), produites par l'instabilité génétique, présentent à des fréquences élevées une instabilité

chromosomique. Deux grands types de réarrangements chromosomiques sont observés : des délétions de grande taille et des amplifications de séquences d'ADN appelées AUD (pour Amplifiable Unit of DNA) (Leblond and Decaris, 1994). La région principalement touchée par ces réarrangements est située aux 2 extrémités du chromosome et a été qualifiée de région instable. Vingt cinq pour-cent environ du chromosome peuvent ainsi être délétés au niveau de cette région sans que la viabilité du mutant ne soit affectée, tout au moins en conditions de laboratoire, montrant qu'elle est dépourvue de gènes essentiels (Leblond *et al.*, 1991; Redenbach *et al.*, 1996). Ainsi, le séquençage des AUD de *Streptomyces* a révélé la présence de gènes de nature variée, comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds ou codant des polycétone synthétases (Leblond and Decaris, 1999). L'élucidation de la structure chromosomique de différents mutants a révélé une grande hétérogénéité dans la taille et la conformation du chromosome, due aux événements de délétions et d'amplifications à ses extrémités. Ces événements de délétion et d'amplification résulteraient d'événements de recombinaison illégitime et homologue. Ainsi, les différents types de mutants peuvent être classés suivant leur conformation chromosomique (Figure 16). Le premier type de mutant présente des TIR de taille réduite, générées par un événement de recombinaison entre une séquence située dans la TIR et une séquence située dans le bras chromosomique (Figure 16A). Le deuxième type de mutant présente un chromosome circulaire, résultant d'un événement de recombinaison entre 2 séquences présentes dans les bras chromosomiques (Figure 16B). Le troisième type de mutant présente des TIR de taille augmentée (Figure 16C). Chez ces mutants, une extrémité aurait été délétée et remplacée par l'autre extrémité par un événement de recombinaison homologue entre 2 gènes dupliqués sur chaque bras. Le quatrième type de mutant présente un chromosome linéaire mais a perdu une des extrémités (Figure 16D). Chez ces mutants, un événement d'amplification est souvent observé (Fischer *et al.*, 1997). Enfin, le dernier type de mutant présente un chromosome circulaire suite à des événements de délétion au niveau des 2 extrémités, une amplification flanquant ces délétions (Figure 16E).

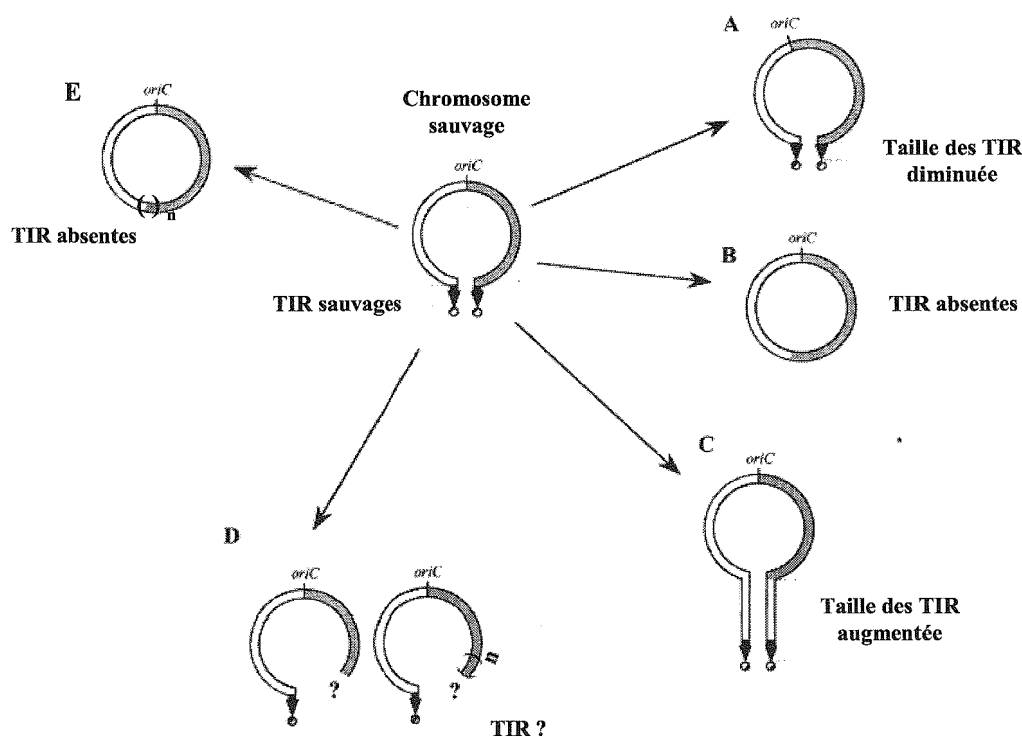


Figure 16 : Types de mutants chromosomiques générés par l'instabilité chez *Streptomyces*. A) Mutant présentant une délétion d'un des bras chromosomique et des TIR de plus petite taille. B) Mutant présentant un chromosome circulaire car délété des 2 extrémités. C) Mutant présentant un échange de la TIR d'un bras vers l'autre bras et une taille de TIR plus grande que la souche sauvage. D) Mutant délété d'une extrémité, présentant un chromosome linéaire et peut-être (?) une amplification (de n fois) de la séquence jouxtant la délétion (d'après Dary *et al.*, 1999). E) Mutant présentant un chromosome circulaire car délété des 2 extrémités. Une amplification ()_n flanque ces délétions (d'après Dary *et al.*, 1999 et Catakli *et al.*, 2003).

4.4 Présentation des mutants Pig⁻pap

4.4.1 Caractéristiques des mutants Pig⁻pap

L'analyse de mutants Pig⁻col et Pig⁻sec de *S. ambofaciens* a montré que ces mutants étaient hétérogènes, dans le sens où la sporulation et la pigmentation était plus ou moins abolie et la quasi-totalité de ces mutants présentait des délétions de taille variable aux extrémités de leur chromosome (Martin *et al.*, 1998).

A l'inverse, l'analyse de plus de 100 mutants Pig⁻pap (issus de papilles dépigmentées) de *S. ambofaciens* a montré qu'ils présentaient tous des caractéristiques communes : ils étaient incapables de sporuler, totalement dépigmentés et sans grand réarrangement génomique. La

caractérisation plus fine de 3 d'entre eux a révélé que leur phénotype mutant était complémentaire par l'introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor*, suggérant qu'ils étaient bloqués très tôt dans le processus de sporulation. L'observation en microscopie électronique à balayage de ces 3 mutants Pig⁻ pap de *S. ambofaciens* a confirmé ces données puisqu'ils présentaient des hyphes aériens droits, phénotype typique des mutants bloqués dans le gène *whiG* décrits chez *S. coelicolor* (Catakli *et al.*, 2005).

4.4.2 Action de facteurs génétiques et environnementaux sur la production de papilles

L'analyse de colonies à papilles a montré que le nombre de papilles par colonie était un caractère héritable. En effet, dans la descendance d'une colonie à faible nombre de papilles, des colonies à faible nombre de papilles étaient observées, alors que des colonies présentant un grand nombre de papilles présentaient des niveaux d'instabilité génétique élevés, donnant naissance à des colonies à grand nombre de papilles, mais également à de nombreux mutants Pig⁻ col. Ces souches ont alors été qualifiées de mutatrices. Ce résultat suggérait donc qu'il existe des mécanismes de contrôle de l'instabilité génétique et chromosomique chez *S. ambofaciens* et que cette instabilité peut être modulée par l'établissement d'un état mutateur d'intensité variable, faible chez les souches sauvages et fort chez les souches mutatrices (Martin *et al.*, 1999).

D'autre part, des travaux antérieurs réalisés par Jean-Nicolas Volff ont mis en évidence que le milieu de culture influençait la production de papilles (Volff, 1994). Sur milieu minimum glucose, les colonies de *S. ambofaciens* présentaient toutes un très grand nombre de papilles (supérieur à 50) alors que lorsque de l'hydrolysate de caséine était ajouté dans ce milieu, les colonies présentaient un faible nombre de papilles (inférieur à 10). Ceci suggère qu'un état mutateur, similaire à celui observé chez les souches mutatrices (Martin *et al.*, 1999), pourrait résulter d'une modification de l'environnement.

4.5 Problématique abordée

L'objectif de ces travaux de thèse a été d'exploiter une situation phénoménologique, la variabilité du nombre de papilles par colonie, pour étudier l'effet du milieu de culture sur l'instabilité génétique chez *Streptomyces* et identifier les facteurs nutritifs plus particulièrement impliqués dans la modulation du taux de mutation chez cette espèce. Notre étude s'est focalisée sur

2 espèces de *Streptomyces*, *S. ambofaciens*, dont l'instabilité génétique avait déjà bien été caractérisée auparavant, et *S. coelicolor*, espèce phylogénétiquement très proche et dont le génome est entièrement séquencé (Bentley *et al.*, 2002).

L'excédent de papilles produites dans certaines conditions nutritives pouvait mettre en évidence une nouvelle classe de mutants, produits spécifiquement dans de telles conditions. La caractérisation de mutants Pig⁻pap issus de papilles obtenues sur des différents types de milieux a montré qu'ils étaient tous de même nature. Cette observation met en évidence un phénomène d'instabilité génétique faible sur milieu complet et d'intensité plus importante lors de certaines conditions nutritives.

Enfin, nous nous sommes interrogés sur l'implication potentielle de la réponse stringente dans l'augmentation du nombre de papilles sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. Nous avons ainsi étudié le mutant *relA* de *S. coelicolor*, mutant incapable de déclencher la réponse stringente, puisque incapable de produire du (p)ppGpp. L'observation phénotypique de ce mutant sur différents milieux a permis d'établir un lien entre réponse stringente et apparition de papilles blanches sur les colonies et donc de mutants Pig⁻pap. L'apparition de papilles sur les colonies de *S. coelicolor* pourrait donc refléter la mise en place d'un état mutateur induit par la réponse stringente. Durant cet état, la production de papilles, correspondant à une instabilité génétique discrète, pourrait être exacerbée.

Résultats

Les travaux qui suivent ont fait l'objet de 2 articles, dont un est paru en 2006 dans *Mutation Research* et le second est en cours de soumission dans ce même journal, et de 2 communications orales. Les 2 articles, qui contiennent le matériel et méthodes, et les 2 communications orales sont insérés à la fin de la partie résultats.

1 Influence d'une limitation en nutriments sur la production de papilles chez *S. ambofaciens* et *coelicolor*

Des résultats préliminaires indiquaient que la production de papilles chez *S. ambofaciens* pouvait être influencée par le milieu de culture. En effet, il avait été observé que lorsque les colonies de *S. ambofaciens* ATCC23877 étaient cultivées sur milieu minimum Glucose, le nombre de papilles produites par colonie était très élevé et que ce dernier diminuait fortement si de l'hydrolysate de caséine était ajouté au milieu de culture (Volff, 1994). Ce résultat suggérait donc que la limitation en nutriments pouvait être un modulateur de la production de papilles blanches à la surface des colonies et donc de mutants Pig⁻ pap. Cette observation nous a amenés à exploiter une situation d'instabilité, qu'est la formation de papilles, en vue de déterminer si les conditions nutritives pouvaient influencer le taux de mutation chez *Streptomyces*

1.1 Détermination du composant responsable de la modulation de la production de papilles

Afin de déterminer le (ou les) facteur(s) nutritif(s) plus particulièrement responsable(s) de cette modulation de l'instabilité génétique, nous avons choisi d'élaborer différents milieux de culture, variant par leur composition et la quantité de chaque composant, et dérivant du milieu HT. En effet, le milieu HT est le milieu complet sur lequel a été précédemment étudiée l'instabilité génétique de *S. ambofaciens*. Il permettait ainsi d'observer le phénotype des colonies après 14 jours de croissance, alors que le milieu minimum Glucose utilisé par Jean-Nicolas Volff ne permettait une observation des colonies qu'après 21 à 28 jours de culture.

La composition des différents milieux utilisés dans ce travail est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu HT et de ses dérivés (HTC). Les concentrations indiquées en caractères gras sont celles qui sont identiques à celles présentes dans le milieu HT.

	Milieu HT	Milieu HTC1	Milieu HTC2	Milieu HTC3	Milieu HTC4	Milieu HTC5	Milieu HTC6	Milieu HTC7	Milieu HTC8	Milieu HTC9	Milieu HTC10
Extrait de levure (DIFCO)	1 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	1 g/l	0,25 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Extrait de boeuf (DIFCO)	1 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Dextrine blanche (PROLABO)	10 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	2,5 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l
Bacto-tryptone (Becton Dickinson)	2 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	2 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	2 g/l	0 g/l	4 g/l	6 g/l	8 g/l
CoCl ₂ (Merck)	20 mg/l	5 mg/l	20 mg/l	5 mg/l	5 mg/l	5 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l	20 mg/l
pH	7,3	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	20 g/l

Les distributions du nombre de papilles par colonie ont été établies pour 2 sous-clones sauvages de *S. ambofaciens*, WT8 et WT12, dont l'instabilité génétique avait été décrite antérieurement (Martin *et al.*, 1998) et pour la souche de *S. coelicolor* A(3)2 M145, espèce phylogénétiquement proche de *S. ambofaciens* et dont le génome a entièrement été séquencé (Bentley *et al.*, 2002). Après 14 jours de croissance à 30°C sur ces différents milieux, les colonies présentaient un diamètre et un taux de germination similaires, permettant d'éliminer l'hypothèse d'une sélection et de comparer les phénotypes en excluant des différences dues à un défaut de germination des spores ou à une croissance plus lente et tardive.

Afin d'établir les distributions du nombre de papilles par colonie (npc), 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées sur chacun des milieux et les valeurs du npc ont été regroupées par 5. Les distributions obtenues pour les 2 sous-clones de *S. ambofaciens* et la souche M145 de *S. coelicolor* sur chacun des milieux sont présentées figures 17, 18 et 19.

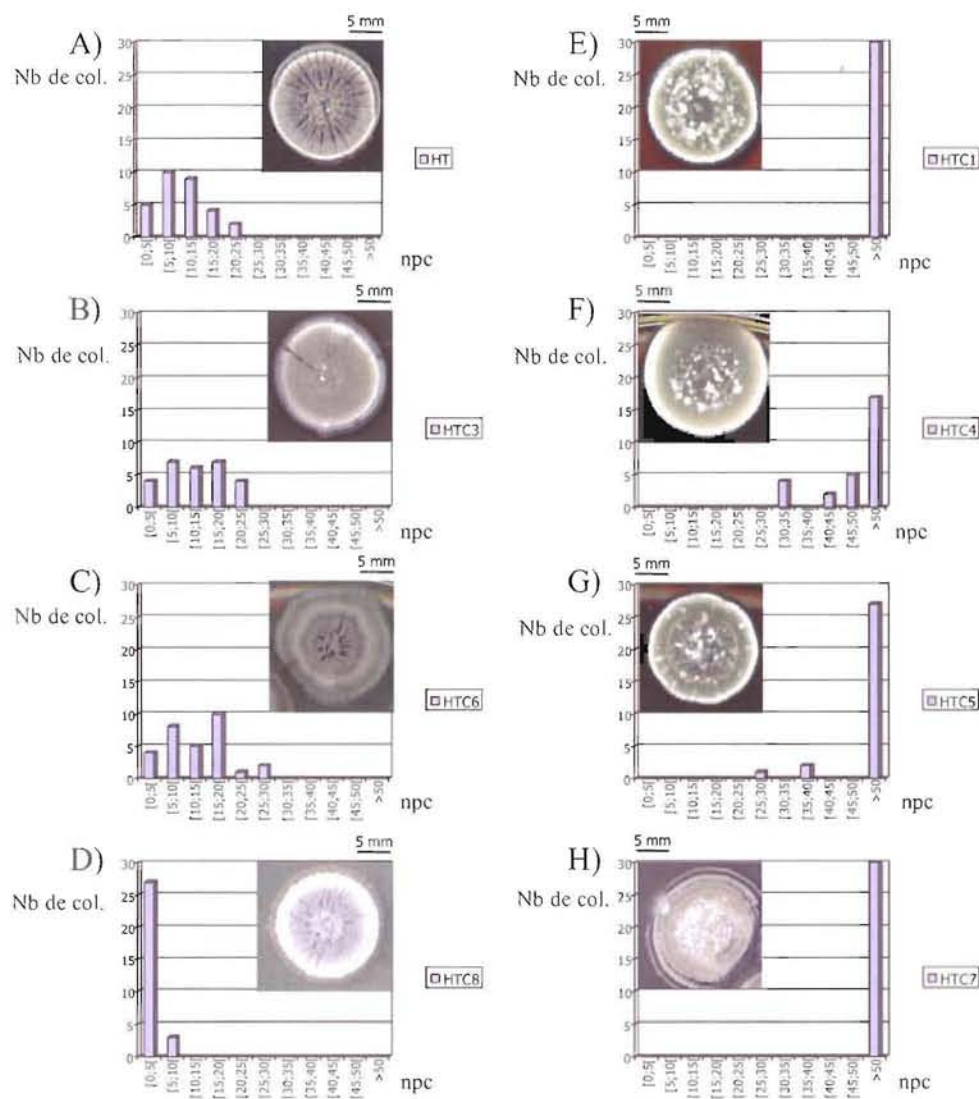


Figure 17 : Représentation graphique de la distribution du npc observée sur milieux HT et HTC pour *S. ambofaciens* WT8 après 14 jours de croissance à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et le npc a été regroupé par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie correspondant au phénotype le plus représenté a été choisie.

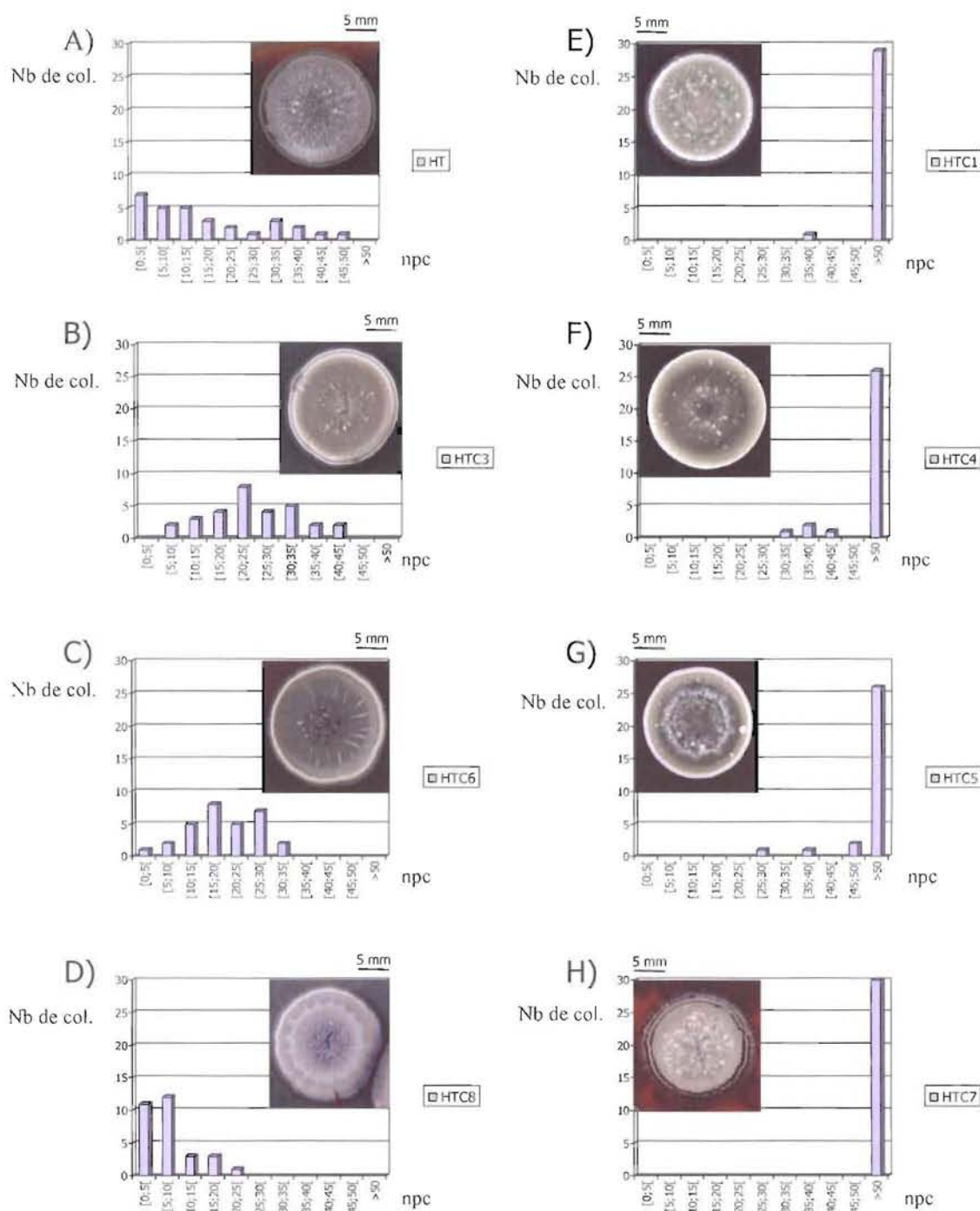


Figure 18 . Représentation graphique de la distribution du npc observée sur milieux HT et HTC pour *S. ambifaciens* WT12 après 14 jours de croissance à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et le npc a été regroupé par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie correspondant au phénotype le plus représenté a été choisie.

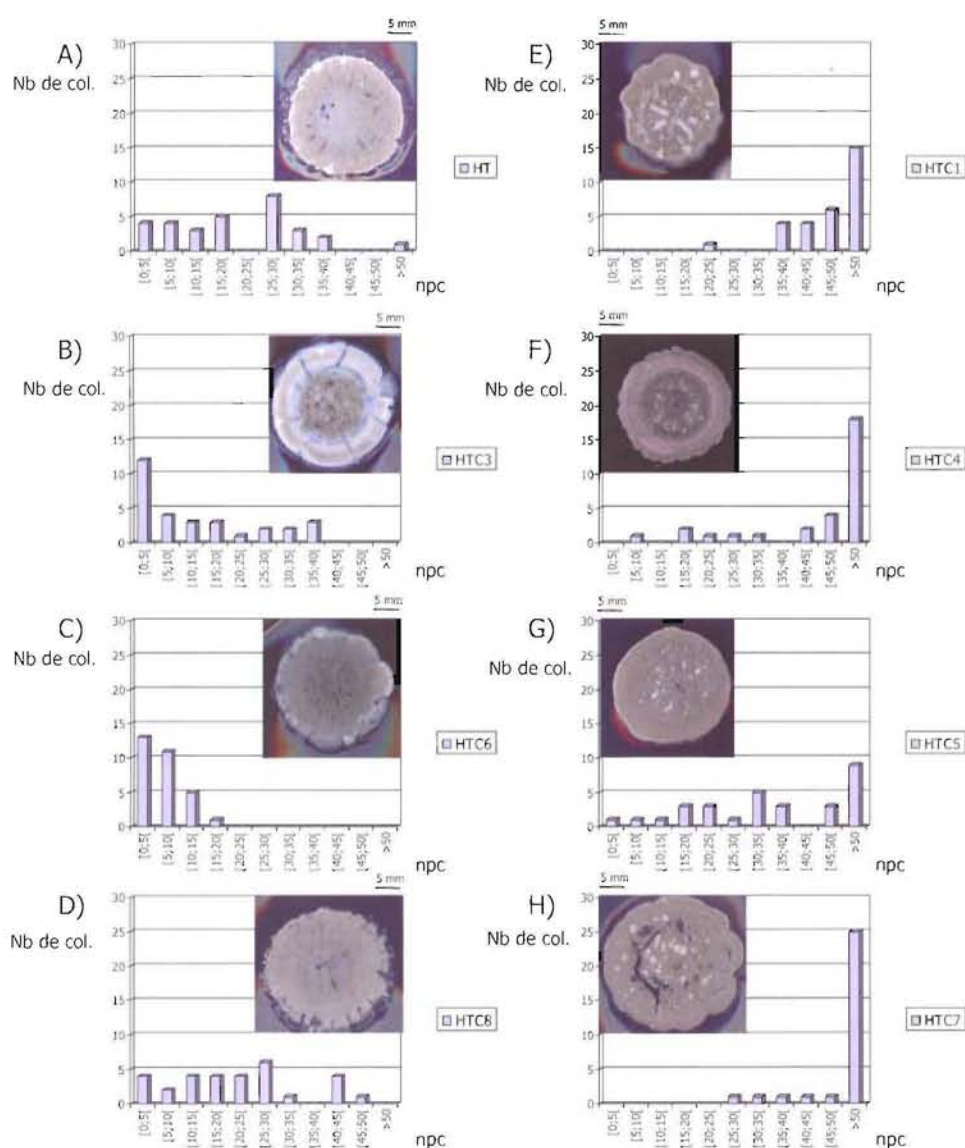


Figure 19 . Représentation graphique de la distribution du npc observée sur milieux HT et HTC pour *S. coelicolor* M145 après 14 jours de croissance à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et le npc a été regroupé par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie correspondant au phénotype le plus représenté a été choisie.

Lors de travaux antérieurs, les distributions du nombre de papilles par colonie produites sur milieu HT pour les souches de *S. ambifaciens* WT8 et WT12 avaient été établies (Martin *et al.*, 1998). Elles avaient permis de démontrer l'existence d'un polymorphisme entre ces 2 sous-clones sauvages, WT8 présentant une distribution du nombre de papilles par colonie aléatoire de type Loi de Poisson, WT12 présentant une distribution en différent

significativement. Dans ce travail, les distributions du nombre de papilles par colonie ont à nouveau été établies et se sont révélées significativement différentes entre le sous-clone WT8 et le sous-clone WT12. Sur milieu HT (Figures 17A, 18A et 19A), le npc variait de 0 à 25 papilles pour la souche WT8 avec une majorité autour de 10 papilles par colonie et autour de 25 papilles pour la souche M145. Les distributions du npc obtenues pour la souche WT12 étaient plus étalées sur l'axe des abscisses, mais la majorité des colonies présentait un faible nombre de papilles (inférieur à 20). Lorsque les souches WT8, WT12 et M145 étaient étalées sur milieu HTC1 (Figures 17E, 18E et 19E), dont la composition variait de celle du milieu HT par la division au quart de la quantité de chaque composant, la quasi-totalité des colonies de WT8 et WT12 (respectivement 30/30 et 29/30) présentait plus de 50 papilles et toutes celles de M145 sauf une présentaient plus de 35 papilles. Le repiquage d'au moins 5 papilles pour chacune de ces 3 souches a montré qu'elles donnaient naissance à des mutants au phénotype dépigmenté stable, assurant qu'il ne s'agissait pas de phénocopies.

Ce résultat suggérait donc que la limitation en nutriments modulait la production de papilles sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. En effet, sur le milieu HTC1, les nutriments deviendraient beaucoup plus rapidement limitants pour le développement des colonies.

Afin de déterminer si un des composants du milieu HT était plus particulièrement responsable de cette modulation de l'instabilité génétique, chaque composant a été remis à sa concentration initiale (celle du HT), alors que les autres composants présentaient des concentrations divisées par 4 par rapport à celles du HT, comme c'était le cas dans le milieu HTC1. Alors que l'ajout de CoCl_2 (HTC2, distribution non montrée), d'extrait de levure (HTC4, Figures 17F, 18F et 19F) ou d'extrait de bœuf (HTC5, Figures 17G, 18G et 19G) n'a pas permis d'observer une très forte réduction du npc, le fait de remettre la concentration de Bacto-tryptone à une valeur similaire à celle présente dans le HT a permis de retrouver une distribution similaire à celle établie pour le milieu HT pour les souches WT8, WT12 et M145 (HTC3, Figures 17B, 18B et 19B). Ce résultat suggère donc que la Bacto-tryptone est le composant dont la limitation influencerait le plus fortement la production de papilles.

Afin d'observer plus précisément quel(s) facteur(s) nutritifs influençai(en)t la production de papilles, nous avons élaboré des milieux dérivant du HT mais variant uniquement par la concentration d'un seul élément. Ainsi, le milieu HTC6 a permis de tester si la concentration en dextrine blanche pouvait également avoir une influence sur le

phénomène étudié. En effet, ce milieu ne différait du HT que par la division par 4 de la quantité de dextrine blanche. Sur ce milieu, après 14 jours de croissance à 30°C, les colonies des souches WT8, WT12 et M145 présentaient un nombre de papilles similaire à celui observé sur milieu HT, indiquant que la concentration en dextrine blanche n'influence pas (ou très peu) la production de papilles (HTC6, Figures 17C, 18C et 19C).

Afin de confirmer l'implication directe de la quantité de Bacto-tryptone sur la production de papilles, les milieux HTC7, HTC8, HTC9 et HTC10 ont été réalisés. Le milieu HTC7 ne différait du HT que par l'absence de Bacto-tryptone alors que les milieux HTC8, HTC9 et HTC10 présentaient respectivement une quantité de Bacto-tryptone doublée, triplée et quadruplée par rapport à celle du HT.

Les colonies cultivées sur milieu HTC7 présentaient toutes un nombre de papilles supérieur à 50 pour WT8 et WT12 et presque toutes pour M145 (Figures 17H, 18H et 19H) alors que sur milieu HTC8, le npc était très faible, plus faible que sur milieu HT (Figure 17D, 18D et 19D). Quant aux colonies cultivées sur milieux HTC9 et HTC10, elles ne présentaient aucune papille après 14 jours de croissance ni même après 3 et 4 semaines de culture à 30°C.

Ces observations ont donc ainsi permis de confirmer que la quantité de Bacto-tryptone à elle seule influence la production de papilles blanches sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

1.2 Détermination de l'élément nutritif responsable de la modulation de la production de papilles

La Bacto-tryptone, hydrolysate tryptique de caséine, est principalement composée d'acides aminés, mais contient également des vitamines et des ions. Afin de déterminer quel(s) élément(s) nutritif(s) étai(en)t plus particulièrement responsable(s) du phénomène observé, la comparaison de la concentration de tous les éléments présents dans les milieux HT, HTC3 (faible npc) et HTC7 (fort npc) a été entreprise (Tableau 4).

Dans la mesure où seules les colonies cultivées sur milieu HTC7 produisaient un grand nombre de papilles, les éléments en plus faible quantité dans ce milieu, par rapport aux milieux HT et HTC3, étaient des candidats potentiels dans l'étude des éléments nutritifs influençant la production de papilles.

Tableau 4 : Composition en ions (%), vitamines (µg/g) et acides aminés (%) de l'extrait de levure (DIFCO), de bœuf (DIFCO) et de la Bacto-tryptone (Becton Dickinson). La quantité totale dans les milieux HT, HTC3 et HTC7, en µg/ml, est indiquée pour chaque élément. Les éléments et chiffres en gras correspondent aux éléments présents en faible quantité dans le milieu HTC7 par rapport aux 2 autres milieux. La composition a été fournie par le fabricant de chacun de ces produits.

		Extrait de levure (% ou µg/g)	Extrait de bœuf (% ou µg/g)	Bacto- tryptone (% ou µg/g)	Extrait de levure dans le HT (µg/ml)	Extrait de bœuf dans le HT (µg/ml)	Bacto- tryptone dans le HT (µg/ml)	Total dans le HT (µg/ml)	Total dans le HTC3 (µg/ml)	Total dans le HTC7 (µg/ml)
ions	Calcium	0,013	0,068	0,013	0,13	0,68	0,26	1,07	0,46	0,81
	Chloride	0,38	1,28	0,186	3,8	12,8	3,72	20,32	7,87	16,6
	Magnésium	0,075	0,239	0,017	0,75	2,39	0,34	3,48	1,12	3,14
	Phosphate	3,27	5,46	2,669	32,7	54,6	53,38	140,68	75,2	87,3
	Potassium	3,195	5,477	0,229	31,95	54,77	4,58	91,3	26,26	86,72
	Sodium	1,49	2,315	2,631	14,9	23,15	52,62	90,67	62,13	38,05
	Sulfate	0,091	0,629	0,241	0,91	6,29	4,82	12,02	6,62	7,2
	Sulfure	0,634	0,707	0,740	6,34	7,07	14,8	28,2	18,15	13,4
	Zinc	0,011	-	0,003	0,11	-	0,06	0,17	0,088	0,11
vitamines	Biotine	3,3	0,1	0,1	0,0033	0,0001	0,0002	0,0036	0,00105	0,0034
	Choline	300	1171,5	350	0,3	1,1715	0,7	2,1715	1,07	1,4715
	Acide folique	1,5	3,3	0,3	0,0015	0,0033	0,0006	0,0054	0,0018	0,0048
	Inositol	1400	4113,2	1400	1,4	4,1132	2,8	8,3132	4,18	5,5132
	Acide nicotinique	597,9	774,7	97,8	0,5979	0,7747	0,1956	1,5682	0,5387	1,3726
	PABA	763	20	3,7	0,763	0,020	0,0074	0,7904	0,2031	0,783
	Acide pantothénique	273,7	91	5,4	0,2737	0,091	0,0108	0,3755	0,102	0,3647
	Pyridoxine	43,2	7,3	0,6	0,0432	0,0073	0,0012	0,0517	0,0138	0,0505
	Riboflavine	116,5	0,4	-	0,1165	0,0004	-	0,1169	0,0292	0,1169
	Thiamine	530	-	0,4	0,530	-	0,0008	0,5308	0,1333	0,5299
	Thymidine	17,5	1093,4	93,4	0,0175	1,0934	0,1868	1,2977	0,4645	1,1109
	Cyanocho- ba- lamine	-	0,5	-	-	0,0005	-	0,0005	0,000125	0,0005
	Alanine	5,36	2,54	2,86	53,6	25,4	57,2	136,2	76,95	79
	Arginine	3,02	1,39	3,03	30,2	13,9	60,6	104,7	71,6	44,1
	Acide aspartique	6,69	1,67	6,11	66,9	16,7	122,2	202,8	143,1	83,6
	Cystéine	0,74	0,18	0,42	7,4	1,8	8,4	17,6	10,7	9,2
	Acide glutamique	14,20	6,01	17,05	142	60,1	341	543,1	391,5	202,1
	acides aminés	Glycine	3,25	4,14	1,75	32,5	41,4	35	108,9	53,475
Histidine		1,20	4,94	2,02	12	49,4	40,4	101,6	55,55	61,4
Isoleucine		3,23	0,53	4,40	32,3	5,3	88	125,6	97,4	37,6
Leucine		4,69	1,00	7,11	46,9	10	1422	199,1	156,425	56,9
Lvsine		5,15	1,45	6,70	51,5	14,5	134	200	150,5	66
Méthionine		1,05	0,30	2,57	10,5	3	51,4	64,9	54,775	13,5
Phénylalanine		2,53	-	3,71	25,3	-	74,2	99,5	80,525	25,3
Proline		2,60	2,16	7,45	26	21,6	149	196,6	160,9	47,6
Sérine		2,84	0,90	4,29	28,4	9	85,8	123,2	95,15	37,4
Thréonine		2,95	0,67	3,58	29,5	6,7	71,6	107,8	80,65	36,2
Tryptophane		1,36	0,05	0,71	13,6	0,5	14,2	28,3	17,725	14,1
Tyrosine		1,20	1,99	1,42	12	19,9	28,4	60,3	36,375	31,9
Valine		3,79	0,86	5,00	37,9	8,6	100	146,5	111,625	46,5

Comme montré dans le tableau 4 en gras, seuls le sodium, le sulfure et 12 acides aminés étaient présents en concentration beaucoup plus faible dans le milieu HTC7 que dans les milieux HT et HTC3 et pouvaient avoir une influence sur la production de papilles.

L'influence potentielle du sodium, du sulfure et des acides aminés sur la production de papilles a alors été plus particulièrement étudiée chez le sous-clone WT8 de *S. ambofaciens*.

1.2.1 Influence du sodium sur la production de papilles

Un milieu HTC7+NaCl a été élaboré en ajoutant au milieu HTC7 une quantité de sodium, sous forme de NaCl, permettant de retrouver une concentration en sodium égale à celle présente dans le milieu HT.

L'analyse des distributions du npc obtenu (Figure 20) a permis de montrer que le NaCl n'avait pas (ou très peu) d'influence sur la production de papilles puisque la quasi-totalité des colonies cultivées sur milieu HTC7+NaCl (Figure 20B) présentait plus de 50 papilles, comme observé sur milieu HTC7 (Figure 20A).

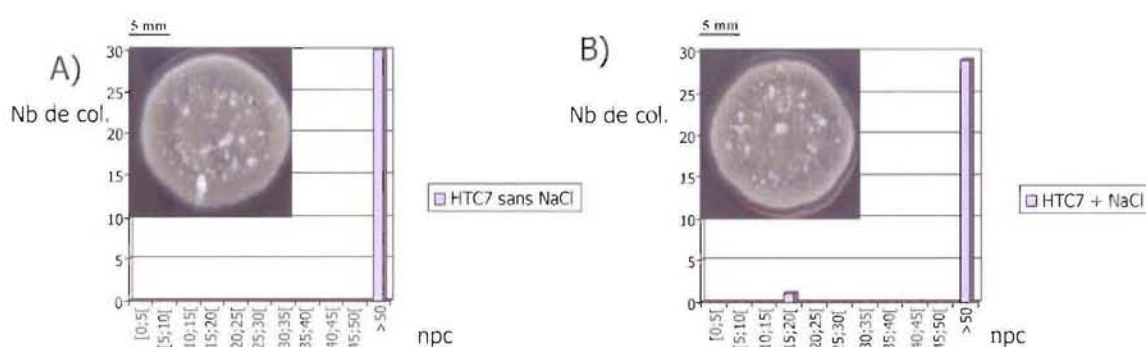


Figure 20 : Représentation graphique de la distribution du npc observée chez *S. ambofaciens* WT8 cultivé sur milieu HTC7 (A) et HTC7+NaCl (B) 14 jours à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et les différentes valeurs du npc regroupées par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie du phénotype le plus représenté a été choisie.

1.2.2 Influence du soufre sur la production de papilles

Afin de tester l'influence potentielle du soufre sur la production de papilles, un milieu HTC7+acide sulfurique a été élaboré. Dans ce milieu, l'ajout d'une quantité de sulfure, sous forme d'acide sulfurique, a été réalisée de manière à avoir une concentration finale en sulfure

identique à celle présente dans le milieu HT. Malgré l'équilibrage du pH à 7,3, le phénotype des colonies ne ressemblait à aucun phénotype déjà observé. En effet, les colonies étaient petites, blanchâtres et à l'aspect duveteux et l'étude de l'influence du sulfure sur la production de papilles n'a pas été poursuivie.

1.2.3 Influence des acides aminés sur la production de papilles

Afin de tester l'influence des acides aminés sur la production de papilles, une solution des 18 acides aminés présents dans la Bacto-tryptone a été préparée. Cette solution a été ajoutée au milieu HTC7 de manière à avoir une concentration finale pour chacun des 18 acides aminés deux fois supérieure à celle du milieu HT (milieu HTC7+aa). La distribution du npc a alors été établie pour la souche *S. ambofaciens* WT8 et les souches M145 et M600 de *S.coelicolor* (Figure 21). La souche M600 sera utilisée dans la suite de ce travail, à la place de la souche M145, car le mutant *relA* utilisé dans la suite des expériences dérivait de la souche M600 et qu'elle présentait une modulation de la production de papilles par la concentration en acides aminés du milieu similaire à ce qui était observé chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* M145 (Figure 21).

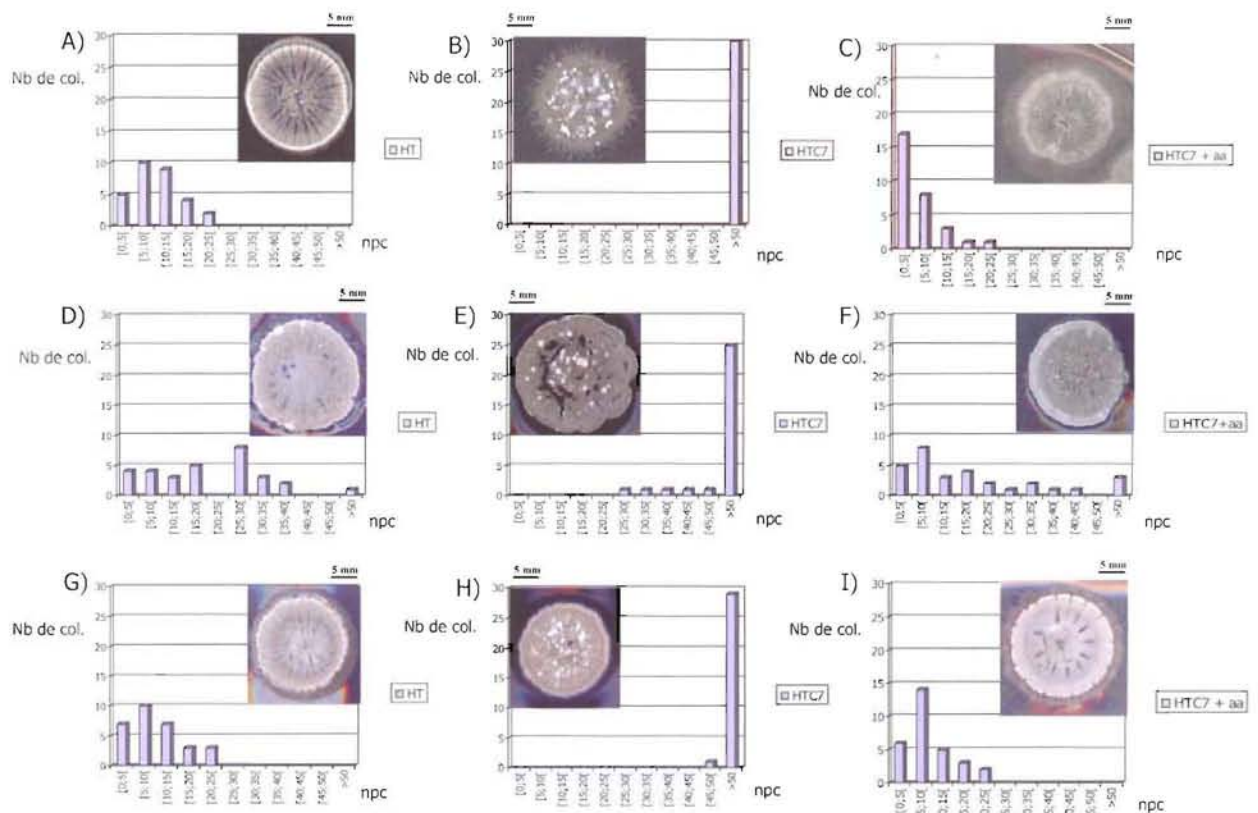
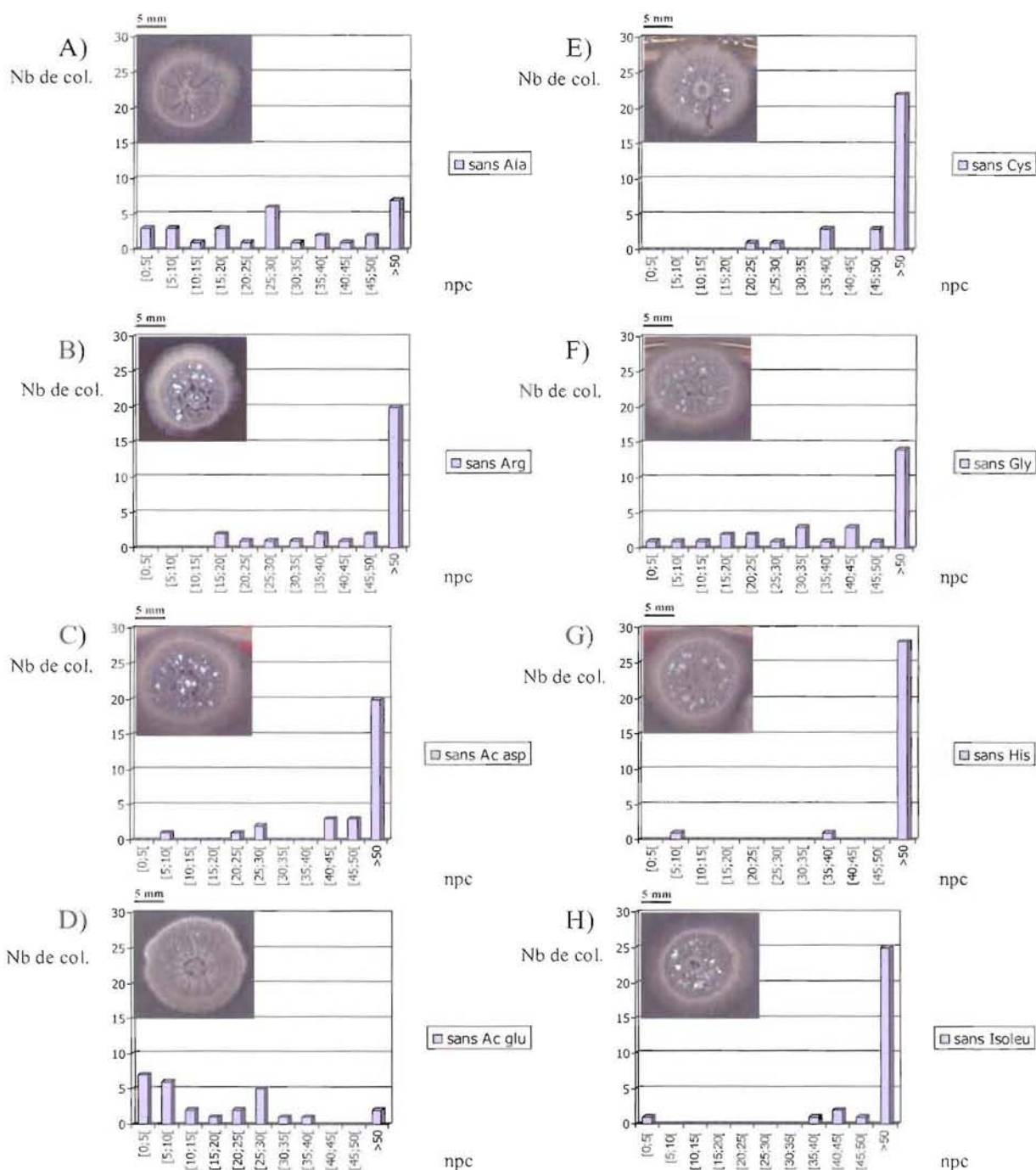


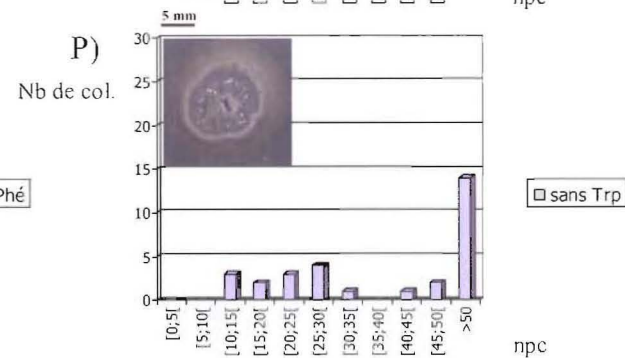
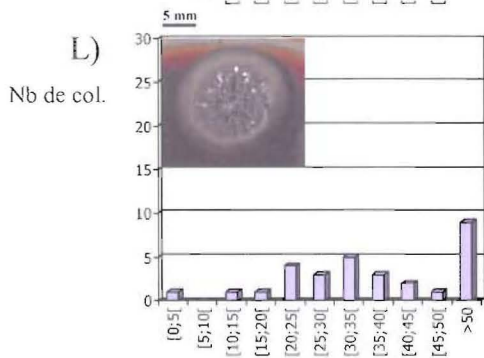
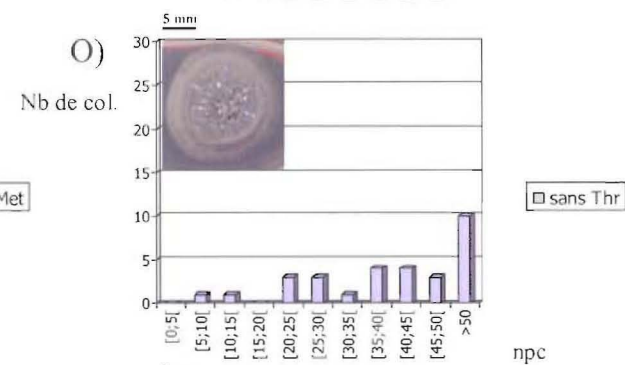
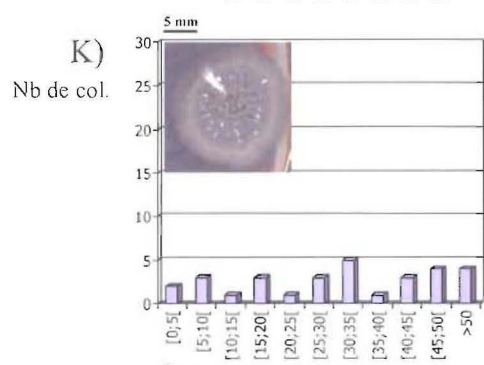
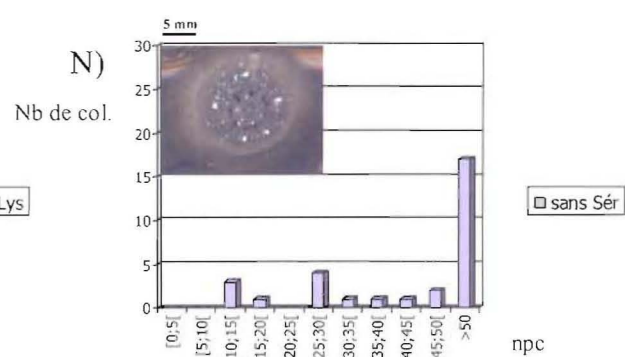
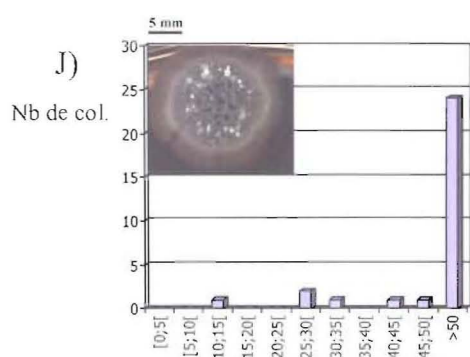
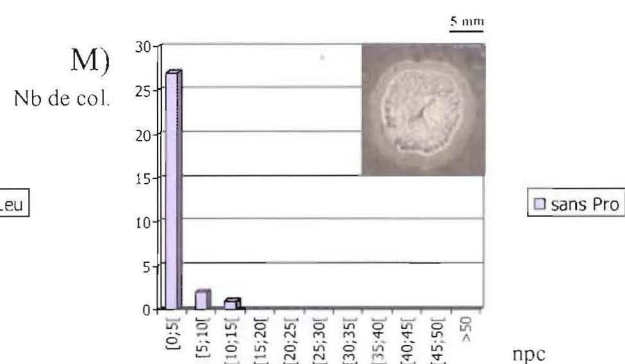
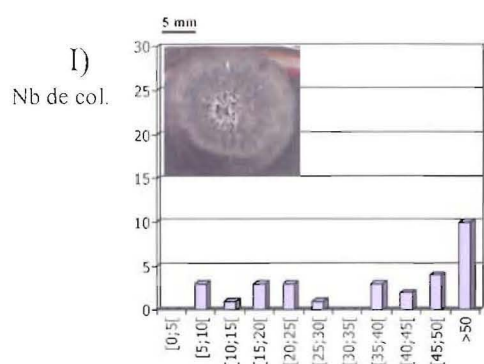
Figure 21 : Représentation graphique de la distribution du npc observée chez les souches de *S. ambofaciens* WT8 (A, B et C) et de *S. coelicolor* M145 (D, E et F) et M600 (G, H et I) cultivées sur milieu HT (A, D et G), HTC7 (B, E et H) et HTC7+aa (C, F et I) 14 jours à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et les différentes valeurs du npc regroupées par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie du phénotype le plus représenté a été choisie.

Les distributions établies sur milieu HTC7+aa (Figure 21C pour WT8, 21F pour M145 et 21I pour M600) étaient significativement différentes de celles observées sur milieu HTC7 (Figure 21B, 21E et 21H). En effet, toutes les colonies des souches WT8 et M600 présentaient un nombre de papilles inférieur à 25, pour la majorité moins de 10 papilles, et la majorité des colonies de la souche M145 présentaient un faible nombre de papilles (inférieur à 20). Ces distributions étaient proches de celles obtenues sur milieu HT (Figure 21A, 21D et 21G).

Ce résultat a donc permis de montrer que la concentration en acides aminés dans le milieu de culture influence à elle seule la production de papilles chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

Afin de déterminer si un des 18 acides aminés était plus particulièrement impliqué dans ce phénomène, des solutions contenant 17 des 18 acides aminés ont été ajoutées au milieu HTC7 et les distributions du npc établies (Figure 22).





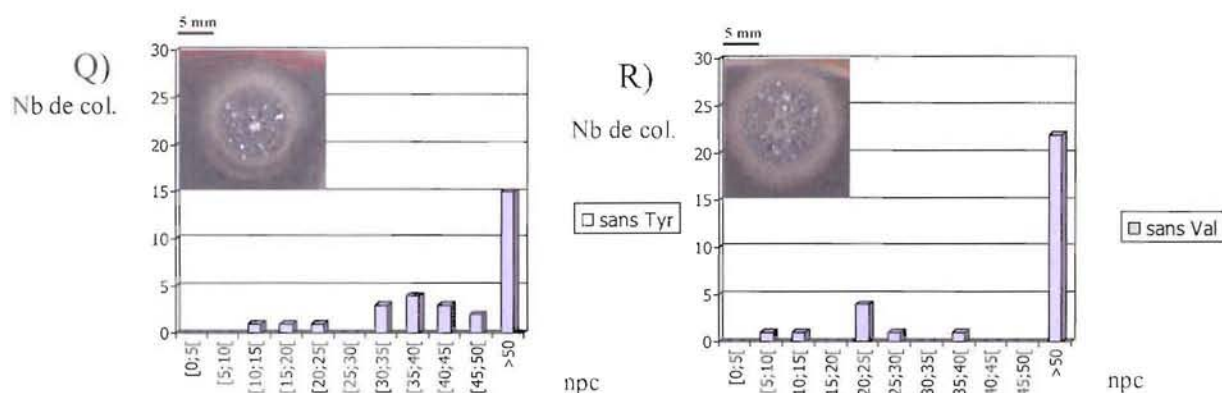


Figure 22 : Représentation graphique de la distribution du npc observée sur milieu HTC7 contenant 17 acides aminés et pas d'alanine (A), d'arginine (B), d'acide aspartique (C), d'acide glutamique (D), de cystéine (E), de glycine (F), d'histidine (G), d'isoleucine (H), de leucine (I), de lysine (J), de méthionine (K), de phénylalanine (L), de proline (M), de sérine (N), de thréonine (O), de tryptophane (P), de tyrosine (Q) ou de valine (R) pour *S. ambofaciens* WT8 après 14 jours de croissance à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et le npc a été regroupé par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie correspondant au phénotype le plus représenté a été choisie.

Les résultats obtenus ont montré pour la quasi-totalité des acides aminés testés, à l'exception de l'acide glutamique, la proline et dans une moindre mesure l'alanine et l'acide glutamique, que l'absence d'un seul des acides aminés était suffisante pour observer des colonies à grand nombre de papilles. Le fait que certains acides aminés aient une plus faible influence sur la production de papilles peut être du à une nécessité de concentration moindre de ces acides aminés que pour d'autres, dont la limitation est suffisante pour observer des colonies à grand nombre de papilles. Une autre hypothèse est de considérer que ces acides aminés, dont la limitation a une influence plus faible sur la production de papilles, puissent être synthétisés par d'autres voies métaboliques. Par exemple, une limitation en méthionine ne permet pas d'observer de façon majoritaire des colonies à grand nombre de papilles (Figure 22K). Ceci pourrait être expliqué soit par un besoin cellulaire moindre en méthionine, soit parce qu'un autre acide aminé présent permet la synthèse de méthionine. Il a par exemple été montré que l'acide aspartique permet la synthèse de plusieurs acides aminés chez différents organismes, par exemple la synthèse de méthionine, de thréonine, de lysine ou d'alanine (Weil, 1983).

2 Caractérisation de mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* issus de différents contextes nutritionnels

2.1 Caractérisation de mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* issus de contextes nutritionnels différents

Lors de travaux antérieurs, la caractérisation de plus de 100 mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens*, résultant d'événements mutationnels indépendants, avait permis de dégager des caractéristiques propres à ces mutants : ils étaient tous dépigmentés, le phénotype mutant était héritable et stable, ils étaient incapables de sporuler et ne présentaient aucun réarrangement chromosomique de grande taille (Martin *et al.*, 1998). Ces mutants étaient issus de colonies cultivées sur milieu HT et ce type de mutants sera désigné dans la suite de ce travail par « mutants Pig⁻pap « HT » », par opposition aux mutants issus de colonies cultivées sur milieu limité en acides aminés et nommés « mutants Pig⁻pap « HTC » ». La caractérisation plus fine de 3 mutants Pig⁻pap « HT » a montré qu'ils étaient tous les 3 bloqués dans les premières étapes du processus de sporulation (Catakli *et al.*, 2005). En effet, une restauration du phénotype sauvage avait été observée après introduction du plasmide pSET152 portant le gène *whiG* de *S. coelicolor*, gène intervenant dans les premières étapes du processus de sporulation. L'introduction des plasmides pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiH*) et pSET152(*whiJ*), gènes intervenant également lors des premières étapes du processus de sporulation chez *S. coelicolor*, n'avait pas permis de restaurer un phénotype sauvage. Les tailles du plasmide pSET152 et des inserts clonés dans chaque cas, dont certains seront utilisés dans la suite de ce travail, sont indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des plasmides (Catakli, 2004) utilisés dans ce travail. La nature des inserts ainsi que la taille de chaque plasmide sont indiquées.

Plasmide	Gène cloné	Taille du plasmide+insert
pSET152	Aucun	5,8 kb
pSET152(<i>whiA</i>)	<i>whiA</i> de <i>S. coelicolor</i>	5,8 kb + 7 kb
pSET152(<i>whiB</i>)	<i>whiB</i> de <i>S. coelicolor</i>	5,8 kb + 6 kb
pSET152(<i>whiG</i>)	<i>whiG</i> de <i>S. coelicolor</i>	5,8 kb + 2,1 kb
pSET152(<i>whiH</i>)	<i>whiH</i> de <i>S. coelicolor</i>	5,8 kb + 5,1 kb
pSET152(<i>whiJ</i>)	<i>whiJ</i> de <i>S. coelicolor</i>	5,8 kb + 4 kb

Enfin, il avait été observé que chez ces 3 mutants Pig⁻pap, le gène *whiG* ne présentait aucune mutation et était transcrit alors que le gène *whiH*, dont la transcription dépend de WhiG, n'était plus transcrit, suggérant une modification post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle de WhiG par rapport à une souche sauvage (Catakli *et al.*, 2005).

Afin de déterminer si les papilles présentes sur les colonies cultivées sur milieux HTC, c'est-à-dire présentant un grand nombre de papilles, donnaient naissance à des mutants Pig⁻pap de phénotype et de nature moléculaire similaires à ceux décrits précédemment, des papilles de colonies de *S. ambofaciens* WT8 et WT12 ont été repiquées jusqu'à obtention de populations homogènes blanches de mutants Pig⁻pap « HTC ». Quatre mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* WT8 et W12 issus des 4 milieux HTC pour lesquels les colonies présentaient un grand nombre de papilles ont ainsi été isolés. Il s'agit des souches WT8pap1 (issue d'une papille d'une colonie de WT8 cultivée sur milieu HTC1), WT8pap4 (issue d'une papille d'une colonie de WT8 cultivée sur milieu HTC4), WT12pap5 (issue d'une papille d'une colonie de WT12 cultivée sur milieu HTC5) et WT12pap7 (issue d'une papille d'une colonie de WT12 cultivée sur milieu HTC7).

2.1.1 Le phénotype des mutants Pig⁻pap « HTC » est héritable et stable

Le taux de réversion spontanée du phénotype mutant des souches WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 et WT12pap7 a été estimé. Pour cela, la présence de colonies grises a été recherchée après étalement d'un grand nombre de colonies de ces 4 souches et croissance 7 jours à 30°C sur milieu HT. Il est à noter que dans ces conditions, la souche sauvage pigmente à partir du 4^{ème} jour. Aucune colonie grise n'a été observée pour les souches WT8pap4 et WT12pap5 sur les 89000 et 53300 colonies respectivement observées. Un révertant pour WT8pap1 et 3 révertants pour WT12pap7 ont été recensés sur un total respectif de 33500 et 57600 colonies. Le taux de réversion spontanée a ainsi été estimé à 5.10^{-5} , taux de réversion similaire à celui déterminé pour les 3 mutants Pig⁻pap « HT » précédemment caractérisés (Catakli *et al.*, 2005).

2.1.2 Les mutants Pig⁻pap « HTC » ne produisent pas de spores

Afin de déterminer si les mutants Pig⁻pap « HTC » de *S. ambofaciens* isolés dans ce travail étaient affectés dans le processus de sporulation, les 4 souches mutantes et les sous-clones sauvages WT8 et WT12 ont été cultivés 7 jours à 30°C sur milieu HT. La présence de spores a été recherchée par observation au microscope photonique de fragments de colonies après une coloration de Gram. Alors que les 2 sous-clones sauvages produisaient des spores, seuls des fragments mycéliens sans spores ont pu être observés dans les préparations correspondant aux 4 souches mutantes. Il est à noter que ce type d'analyse est qualitatif et ne permet pas d'exclure la présence de quelques spores.

2.1.3 Les mutants Pig⁻pap « HTC » ne présentent pas de grand réarrangement génomique

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de grand réarrangement chromosomique chez les mutants Pig⁻pap « HTC », des profils *AseI* de l'ADN génomique de ces 4 souches et du sous-clone WT8 ont été réalisés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). L'exemple des profils obtenus pour les souches WT8 et WT8pap4 est présenté sur la figure 23A. Tous les fragments de restriction présents dans la souche WT8 l'étaient également

chez WT8pap4 (Figure 23A) ainsi que chez les 3 autres mutants Pig^- pap analysés. Ces résultats confirment l'absence de grands réarrangements, notamment aux extrémités du chromosome, constituées des fragments de restriction *AseI* G, D, L, I et E, région très sujette aux remaniements (Figure 23B).

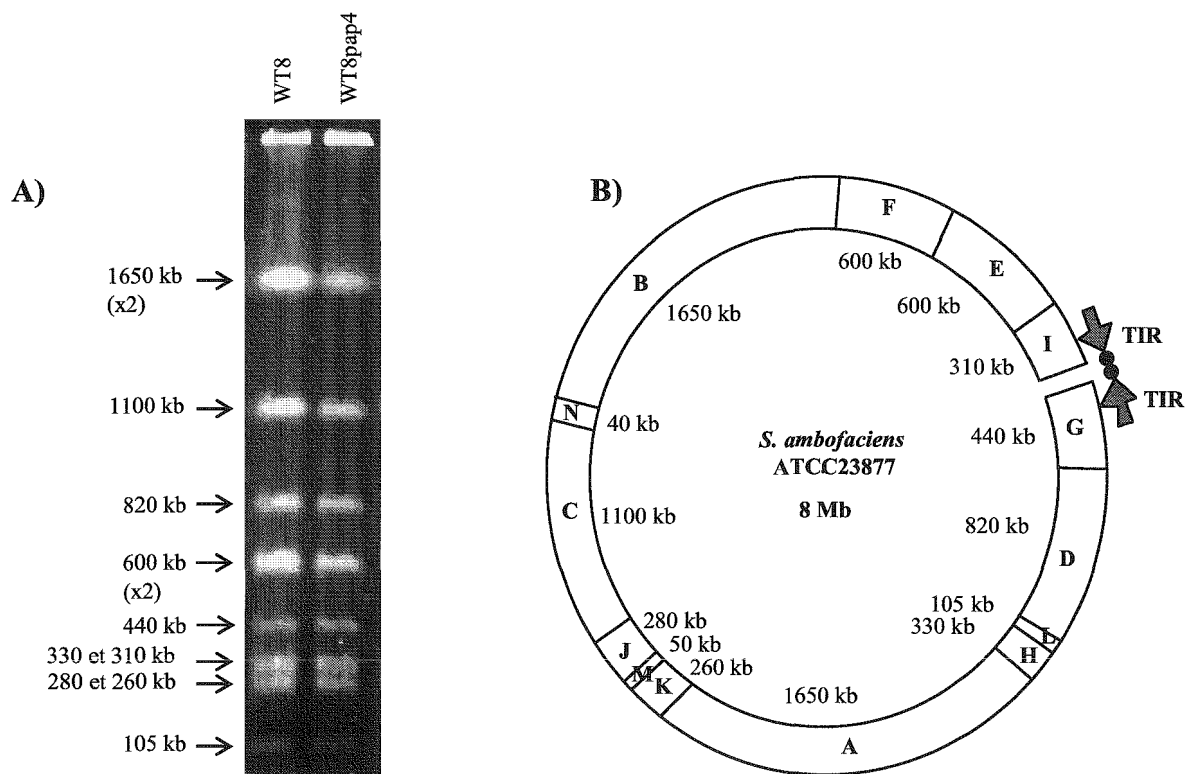


Figure 23 : A) Profils *AseI* de l'ADN génomique des souches WT8 et WT8pap4 obtenus par PFGE après 24 h de migration en TBE 0,5x, à 6V/cm (pulse de 40 à 160 sec). La taille des fragments de restriction *AseI* est indiquée.

B) Carte physique du chromosome de *S. ambofaciens* ATCC23877. Le nom et la taille des fragments *AseI* sont indiqués, ainsi que les répétitions terminales inversées (TIR) liées de façon covalente à des protéines. Les fragments G, D, L, I et E constituent les extrémités instables (Leblond *et al.*, 1996).

2.1.4 Les mutants Pig^- pap « HTC » sont complémentables par le gène *whiG*

Afin de déterminer si les 4 mutants Pig^- pap « HTC » isolés au cours de ce travail étaient bloqués au même stade de sporulation que ceux analysés par Catakli *et al.* (2005), des expériences de complémentation ont été réalisées. Le plasmide pSET152 seul et le plasmide pSET152(*whiG*) ont été introduits dans la souche d'*E. coli* MRF'307 puis transférés par conjugaison intergénérique dans les 4 souches WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 et

WT12pap7. Ces plasmides sont capables de se répliquer de façon autonome chez *E. coli* mais pas chez *Streptomyces*. Dans cette espèce, leur maintien dépend de leur intégration site-spécifique au génome au niveau du site *attB* du phage Φ C31.

Tous les transconjugants obtenus après introduction du plasmide pSET152(*whiG*) présentaient un phénotype sauvage, c'est-à-dire un retour à la pigmentation grise, à la sporulation et à la production de papilles (Figure 24). L'introduction du plasmide pSET152 seul n'a pas permis cette restauration, les transconjugants WT8pap1pSET, WT8pap4pSET, WT12pap5pSET et WT12pap7pSET présentant un phénotype dépigmenté, comme les mutants Pig⁻pap dont ils étaient issus. Les 4 transconjugants WT8pap1G, WT8pap4G, WT12pap5G et WT12pap7G, issus respectivement des 4 souches mutantes WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 et WT12pap7 après introduction de pSET152(*whiG*), ont ainsi été isolés.

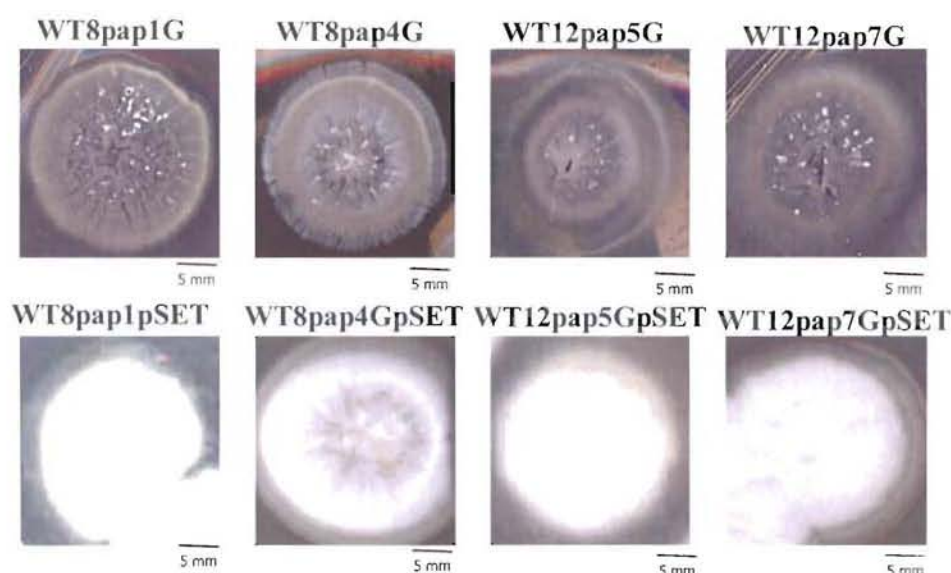


Figure 24 : Phénotypes des souches WT8pap1G, WT8pap4G, WT12pap5G, WT12pap7G, WT8pap1pSET, WT8pap4pSET, WT12pap5pSET et WT12pap7pSET après 14 jours de croissance à 30°C sur milieu HT. Ces souches ont été obtenues après introduction du plasmide pSET152(*whiG*) ou pSET152 dans les mutants Pig⁻pap WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 et WT12pap7.

Ainsi, le fait que les 4 mutants Pig⁻pap « HTC » analysés soient complémentables par introduction du gène *whiG* de *S. coelicolor* confirme que, à l'instar des mutants Pig⁻pap « HT » caractérisés antérieurement, ils sont bloqués dans les premières étapes du processus de sporulation.

2.1.5 Caractérisation de papilles issues de transconjugants gris

Le fait que les transconjugants gris WT8pap1G, WT8pap4G, WT12pap5G et WT12pap7G produisaient à nouveau des papilles blanches à la surface de leurs colonies malgré la présence d'une copie additionnelle du gène *whiG* nous a amenés à entreprendre l'étude de ces papilles. Huit populations de mutants Pig⁻pap ont ainsi été isolées à partir de 2 papilles issues d'événements mutationnels indépendants pour chacune des 4 souches. Ces mutants ont été appelés WT8pap1GpA, WT8pap1GpB, WT8pap4GpA, WT8pap4GpB, WT12pap5GpA, WT12pap5GpB, WT12pap7GpA et WT12pap7GpB. L'hybridation du plasmide pSET152(*whiG*) sur des profils de restriction *Bam*HI de l'ADN génomique de ces 8 mutants a permis de révéler que 6 d'entre eux avaient perdu la construction introduite, expliquant ainsi le retour au phénotype mutant. Les mutants WT12pap5GpA et WT12pap7GpB présentaient quant à eux le plasmide pSET152(*whiG*) inséré au niveau du site *attB* du phage ΦC31. Ce plasmide a été amplifié par Long-Range PCR (Polymerase Chain Reaction) puis des réactions de PCR ont été réalisées sur le produit obtenu à l'aide de 3 couples d'oligonucléotides, G1/G2, G3/G4 et G5/G6 (Catakli *et al.*, 2005), permettant l'amplification de la totalité du gène *whiG* de *S. coelicolor* (régions promotrice et terminatrice incluses) porté par le plasmide pSET152 (Figures 25 et 26). Ces 2 étapes de Long-Range PCR puis de PCR permettaient de n'amplifier que le transgène *whiG* et d'éliminer les signaux dus au gène *whiG* présent dans le génome de *S. ambofaciens*.

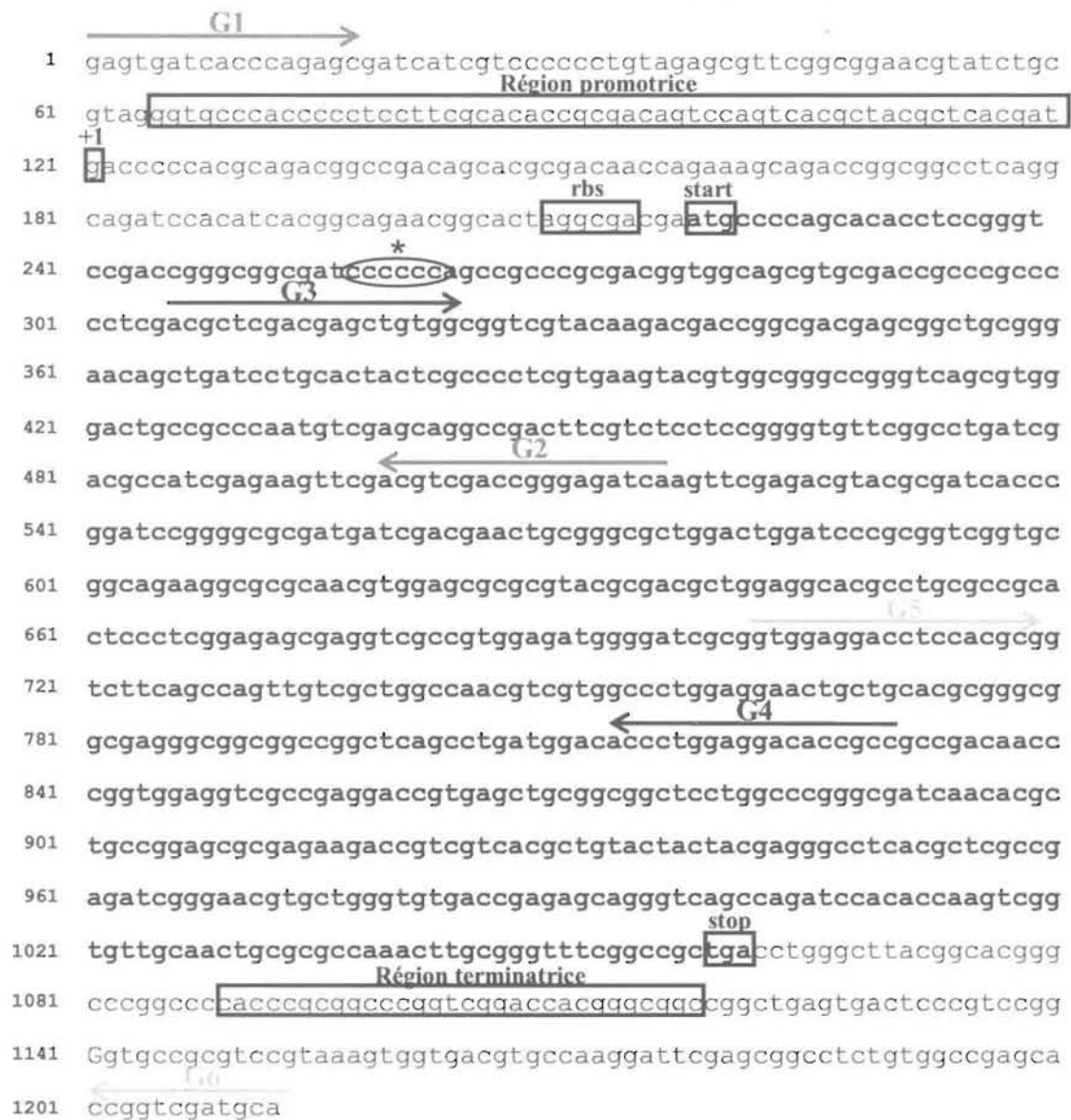


Figure 25 : Séquence du gène *whiG* de *S. coelicolor* et localisation des oligonucléotides (marqués par des flèches) utilisés pour amplifier puis séquencer les différentes portions de ce gène. Les régions promotrice et terminatrice, la séquence rbs, le start de transcription (+1) (Kelemen *et al.*, 1996) et les codons start et stop sont encadrés. La série de 6 cytosines dans laquelle ont été identifiées les mutations affectant le transgène *whiG* des souches WT12pap5GpA et WT12pap7GpB est entourée et marquée d'un astérisque.

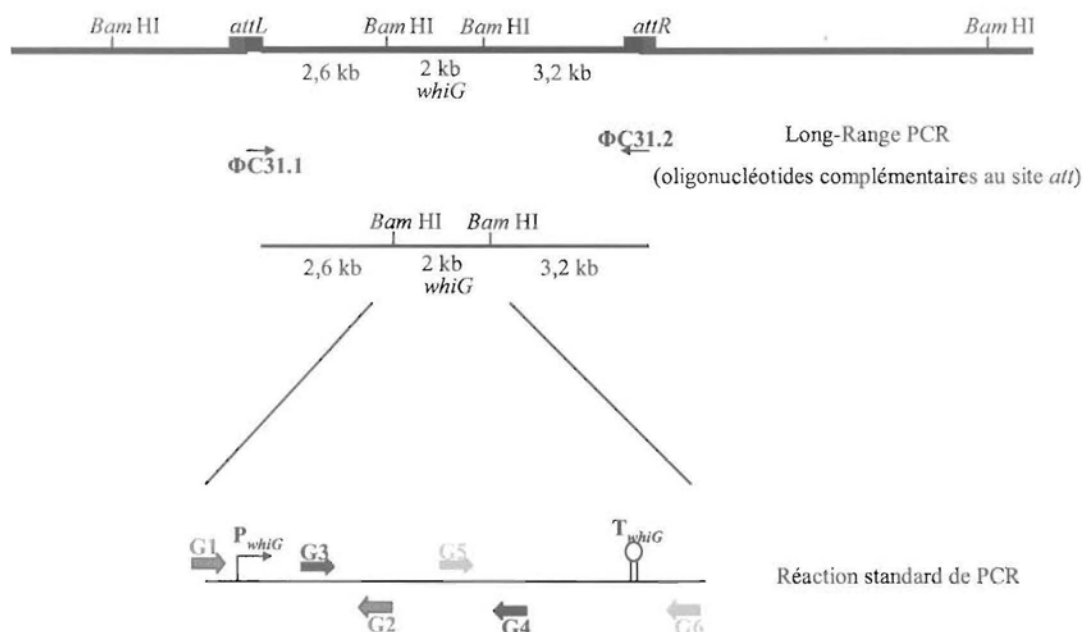


Figure 26 : Représentation schématique des réactions de Long-Range PCR utilisant des oligonucléotides ($\Phi C31.1$ et $\Phi C31.2$) complémentaires des sites adjacents au site *att*, puis de PCR standard permettant l'amplification du transgène *whiG* à l'aide des couples d'oligonucléotides G1/G2, G3/G4 et G5/G6. La localisation des régions promotrice et terminatrice du transgène *whiG* est indiquée.

Les 3 produits de PCR obtenus pour le transgène *whiG* de chacun des mutants ont été séquencés. Les séquences obtenues ne présentaient aucun artéfact pouvant être dû à un mélange de signaux correspondant à 2 gènes *whiG* différents (ces gènes présentent 90,2 % d'identité entre *S. coelicolor* et *S. ambofaciens*) et correspondaient à la séquence du gène *whiG* de *S. coelicolor*, attestant que seul le transgène, et non la copie résidente de *S. ambofaciens*, avait été amplifié et séquencé. L'analyse des séquences a permis de mettre en évidence la présence d'une mutation de type frameshift +1 (insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines à la position 257, figure 25) en 5' du gène, provoquant un décalage du cadre de lecture et la production d'une protéine WhiG très courte et vraisemblablement inactive. En effet, elle est déléetée des régions 2.4 et 4.2, régions nécessaires à la reconnaissance des promoteurs des gènes régulés par ce facteur σ , comme c'est le cas pour tous les facteurs σ de la famille σ^{70} (Figure 27). Cette mutation est présente dans le transgène *whiG* des 2 mutants WT12pap5GpA et WT12pap7GpB et explique le retour au phénotype mutant.

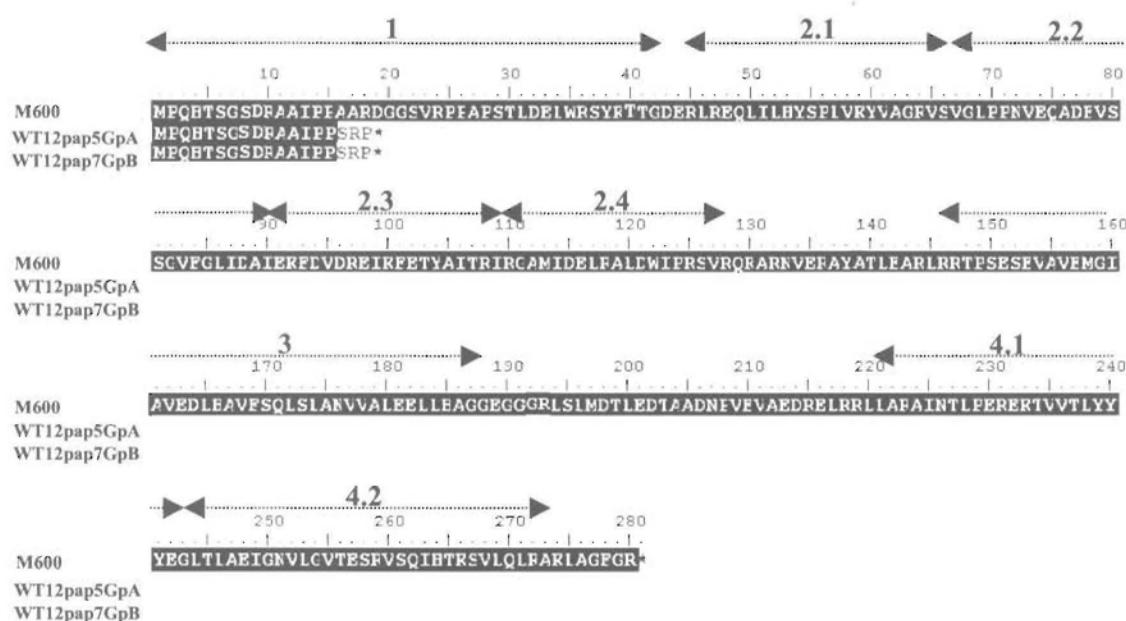


Figure 27 : Alignement de la séquence protéique de WhiG de *S. coelicolor* M600 et du transgène des 2 transconjugants WT12pap5GpA et WT12pap7GpB. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blanc sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de M600 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Les régions caractéristiques des facteurs σ appartenant à la famille des facteurs σ^{70} sont indiquées par des double flèches.

Ainsi, le plasmide pSET152(*whiG*) introduit dans les mutants Pig⁻pap de *S. ambifaciens* apparaît être très mutable, puisque dans 6 cas sur 8 un événement de perte du plasmide a été observé et dans 2 cas sur 8 une mutation dans le transgène *whiG* a été détectée.

2.1.6 Estimation de la stabilité des plasmides pSET152 et pSET152(*whiG*)

L'absence du plasmide recombinant dans 6 des 8 mutants Pig⁻pap caractérisés précédemment suggérait que le plasmide pSET152(*whiG*) pouvait être très instable. Afin d'estimer cette instabilité, la fréquence de perte de la résistance à l'apramycine (gène porté par le plasmide) a été déterminée chez des souches produisant des spores, considérées comme unigénomiques dans la quasi-totalité des cas. Les plasmides pSET152 et pSET152(*whiG*) ont donc été introduits par conjugaison dans les sous-clones sauvages WT8 et WT12. Les souches WT8pSET, WT8G, WT12pSET et WT12G ont ainsi été obtenues. Les souches WT8pSET et

WT12pSET comportaient le plasmide pSET152 dans leur génome et les souches WT8G et WT12G, le plasmide pSET152(*whiG*). Afin de déterminer le taux de colonies devenues sensibles à l'apramycine pour les souches WT8pSET, WT8G, WT12pSET et WT12G, des suspensions de mycélium et de spores des 4 souches ont été filtrées, de manière à récupérer essentiellement les spores, et étalées sur milieu HT solide à raison d'environ 100 colonies par boîtes puis répliquées, après 4 jours d'incubation à 30°C, sur des boîtes de HT supplémenté en apramycine (30 µg/ml). Les colonies absentes sur les boîtes contenant du milieu HT supplémenté en apramycine et présentes sur les boîtes contenant du milieu HT sans apramycine (contrôle de réplique) ont été repiquées une fois sur du milieu HT contenant de l'apramycine pour vérifier leur sensibilité.

Pour la souche WT12pSET, seule 1 colonie présentait une sensibilité à l'apramycine sur 4700 colonies observées (fréquence de perte de la résistance à l'apramycine : 2.10^{-4}). Pour la souche WT12G, les 3900 colonies observées étaient résistantes à l'apramycine (fréquence $< 2,6.10^{-4}$). Pour la souche WT8pSET, 2 colonies sur 2200 observées n'étaient plus résistantes à l'antibiotique (fréquence : 9.10^{-4}). Enfin, pour WT8G, une seule colonie sur les 8500 observées apparaissait sensible à l'apramycine (fréquence : 1.10^{-4}).

Ainsi, la perte de la résistance à l'apramycine dans les spores a été observée à des fréquences de l'ordre de 10^{-4} . Cet événement apparaît donc relativement rare. A l'inverse, chez les mutants Pig⁻pap issus des transconjugants gris, passés par un état papille, sur les 8 mutants précédemment caractérisés, seul 2 présentaient encore le caractère de résistance à l'apramycine, soit une fréquence de perte de la résistance de 0,75.

Ces résultats suggèrent que le passage par un état papille semble favoriser la perte du plasmide pSET152 porteur du gène *whiG* chez les mutants Pig⁻pap par rapport à la fréquence de perte dans les spores qui ne sont pas passées par cet état papille.

2.1.7 Les mutants Pig⁻pap « HTC » présentent une mutation du gène *whiG*

Le séquençage du gène *whiG* a été entrepris chez les souches WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 et WT12pap7 afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de mutation dans ce gène. Pour cela, les 3 couples d'oligonucléotides G1/G2, G3/G4 et G5/G6 ont été utilisés pour amplifier la totalité du gène *whiG* (régions promotrice et terminatrice incluses) des 4 mutants Pig⁻pap et les 12 produits de PCR ainsi obtenus ont été séquencés. Ces

expériences de séquençage ont permis de révéler la présence d'une mutation dans le gène *whiG* des 4 mutants Pig⁻pap analysés (Figure 28).

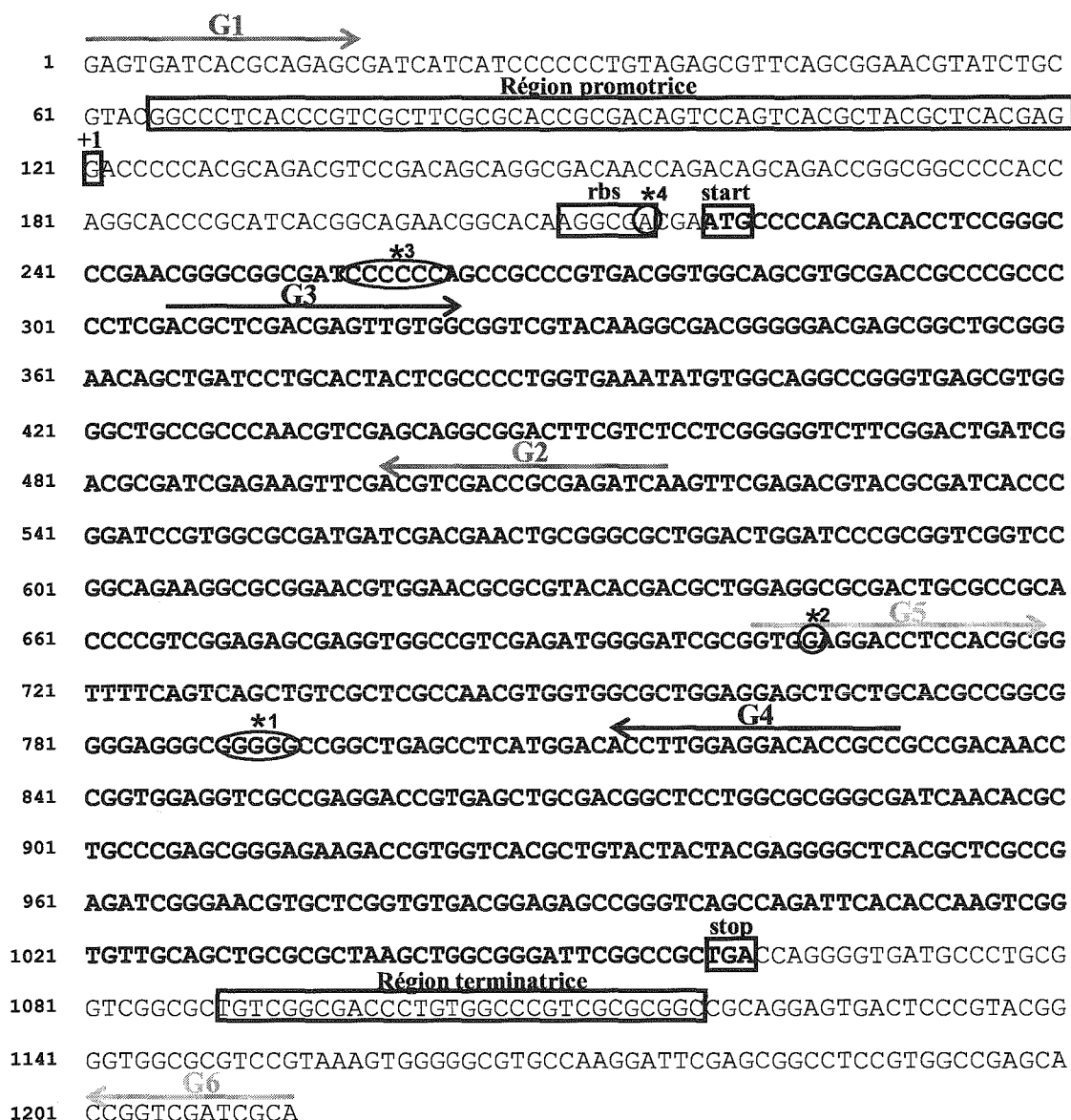


Figure 28 : Séquence du gène *whiG* de *S. ambifaciens* WT8 et localisation des oligonucléotides (marqués par des flèches) utilisés pour amplifier puis séquencer les différentes portions de ce gène. Les régions promotrice et terminatrice, la séquence rbs, le start de transcription (+1) putatif et les codons start et stop sont encadrés. Les séquences entourées correspondent aux endroits où des mutations ont été détectées dans les 4 mutants Pig⁻pap « HTC ». Elles sont notées *1 pour WT8pap1, *2 pour WT8pap4, *3 pour WT12pap5 et *4 pour WT12pap7.

Le mutant WT8pap1 présentait une mutation de type frameshift -1 (délétion d'une guanine dans une série de 5 guanines en position 789, figure 28) en 3' de l'ORF, provoquant

un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un codon stop (Figure 29). La protéine ainsi produite est déletée de sa partie C-terminale et notamment de la région 4.2 nécessaire à la reconnaissance de la boîte -35 des gènes régulés par σ^{whiG} , rendant probablement inactif ce facteur σ . La souche WT8pap4 présentait une substitution (position 705, figure 28) modifiant un codon GAG, spécifiant un acide glutamique, en codon TAG, tronquant la protéine de toute sa partie C-terminale et de sa région 4.2 (Figure 29). La souche WT12pap5 présentait une mutation de type frameshift +1 (insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines à la position 257, figure 28) en 5' du gène, mutation identique à celle détectée dans le transgène *whiG* des souches WT12pap5GpA et WT12pap7GpB, provoquant un décalage du cadre de lecture et la production d'une protéine WhiG très courte et vraisemblablement inactive (Figure 29). Enfin, la souche WT12pap7 présentait une substitution d'une adénine en cytosine dans la séquence rbs du gène (position 215, figure 28), pouvant perturber la traduction chez ce mutant.

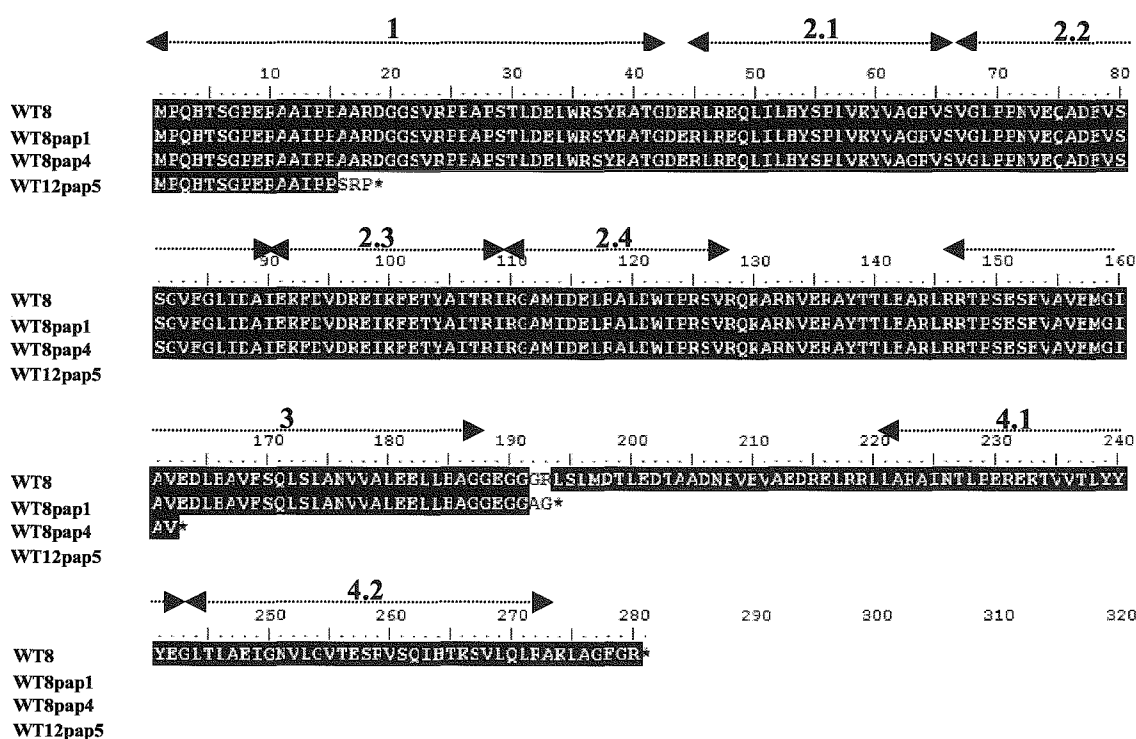


Figure 29 : Alignement de la séquence protéique de WhiG de WT8 et des 3 mutants Pig_pap « HTC » WT8pap1, WT8pap4 et WT12pap5. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blanc sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de WT8 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Les régions caractéristiques des facteurs σ appartenant à la famille des facteurs σ^{70} sont indiquées par des double flèches. La protéine WhiG du mutant WT12pap7 n'est pas représentée puisqu'elle ne diffère pas de la protéine sauvage, la mutation détectée affectant un nucléotide dans la séquence rbs, donc en dehors de l'ORF.

Ainsi, à l'instar des mutants Pig⁻pap issus de papilles obtenues sur des colonies cultivées sur milieu HT et caractérisés antérieurement, les mutants Pig⁻pap issus de milieux pauvres en acides aminés sont phénotypiquement stables, ne sporulent pas, sont complémentables par le gène *whiG* de *S. coelicolor* et ne présentent pas de grands réarrangements génomiques. Cependant, une mutation dans leur gène *whiG* a été détectée, différant de ce qui avait été trouvé par Catakli *et al.* (2005) pour 3 mutants Pig⁻pap « HT ».

Afin de déterminer si les mutants issus des 2 contextes nutritionnels étaient différents ou si les différences observées étaient dues au fait que l'échantillon était petit et peut-être non représentatif, 16 mutants Pig⁻pap issus de papilles obtenues sur milieu HT (nommés 1papHT à 16papHT) et 10 mutants Pig⁻pap issus de papilles obtenues sur milieu HTC7 (nommés 1pap7 à 10pap7) ont été isolés et analysés dans la suite de ce travail. Chaque mutant provenait d'une papille issue de colonies cultivées sur des boîtes de Pétri différentes, afin de s'assurer que les événements mutationnels étudiés soient indépendants.

2.1.8 Caractérisation moléculaire de mutants Pig⁻pap *S. ambofaciens* grâce à l'utilisation de la technique de SSCP

Le séquençage étant une technique relativement longue, nous avons décidé d'entreprendre des expériences de SSCP (pour Single Strand Conformation Polymorphism), technique simple et rapide de détection de polymorphisme, basée sur la conformation spatiale spécifique de la séquence d'un monobrin d'ADN. La présence d'une substitution ou d'une mutation frameshift +1 ou -1 peut être suffisante pour modifier la conformation du fragment d'ADN (Orita *et al.*, 1989). Une dénaturation suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes permet de détecter la présence d'une mutation car le fragment muté, présentant une conformation différente du fragment sauvage, migrera différemment (Figure 30).

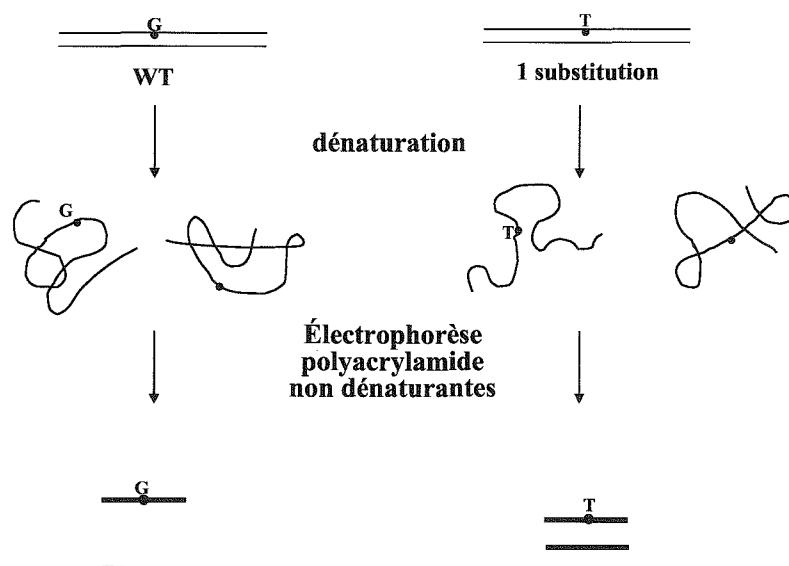


Figure 30 : Principe de la technique de SSCP. Les ADN de 2 allèles, le sauvage présentant une guanine (G) et le mutant une substitution consistant en une thymine (T) à la place de cette guanine, sont chauffés 4 min à 95°C afin de provoquer leur dénaturation puis mis rapidement sur glace. Ils subissent ensuite une migration sur gel de polyacrylamide 8%, TBE 0,6x, à 20W pendant 4 heures, en conditions non dénaturantes. La conformation spécifique de chaque monobrin d'ADN va influencer la distance de migration et permettre la détection de polymorphisme.

Un des paramètres importants d'optimisation de cette technique est la taille du fragment d'ADN analysé. Une des mutations fréquemment observées dans le gène *whiG* consistait en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines. Cette mutation avait en effet été détectée dans le gène *whiG* de *S. coelicolor* porté par le plasmide pSET152 présent dans les souches WT12pap5GpA, WT12pap7GpB (cf paragraphe 2.1.5), pap3Gp2 et pap3Gp4, souches caractérisées antérieurement (Catakli *et al.*, 2005) ainsi que dans le gène *whiG* du mutant de *S. ambofaciens* WT12pap5 (cf. paragraphe 2.1.7). La taille de fragment optimale permettant la détection de mutations a été recherchée. Pour cela, quatre couples d'oligonucléotides ont été choisis autour de cette mutation frameshift, de façon à amplifier des fragments de 155, 205, 278 et 348 pb, respectivement avec les couples SSCP1/SSCP2, SSCP1/SSCP3, SSCP1/SSCP4 et SSCP1/SSCP5 (Figure 31). Les ADN matrices correspondent aux ADN génomiques de la souche sauvage M600 et des mutants de *S. ambofaciens* WT12pap5GpA et WT12pap7GpB, mutés dans le transgène *whiG*.



Figure 31 : Localisation des 5 amorces utilisées pour optimiser les conditions de SSCP. Le couple SSCP1/SSCP2 permet d'amplifier un fragment de 155 pb, SSCP1/SSCP3 de 205 pb, SSCP1/SSCP4 de 278 pb et SSCP1/SSCP5 de 348 pb. Les ADN utilisés comme matrices lors des réactions de PCR correspondent au gène *whiG* de la souche sauvage de *S. coelicolor* M600 et aux transgènes des souches WT12pap5GpA et WT12pap7GpB, présentant l'insertion d'une cytosine (C) dans une série de 6 cytosines. Le codon start et la localisation de la mutation frameshift +1 sont indiqués.

Les produits d'amplification obtenus ont été dénaturés et déposés sur gel de polyacrylamide (Figure 32).

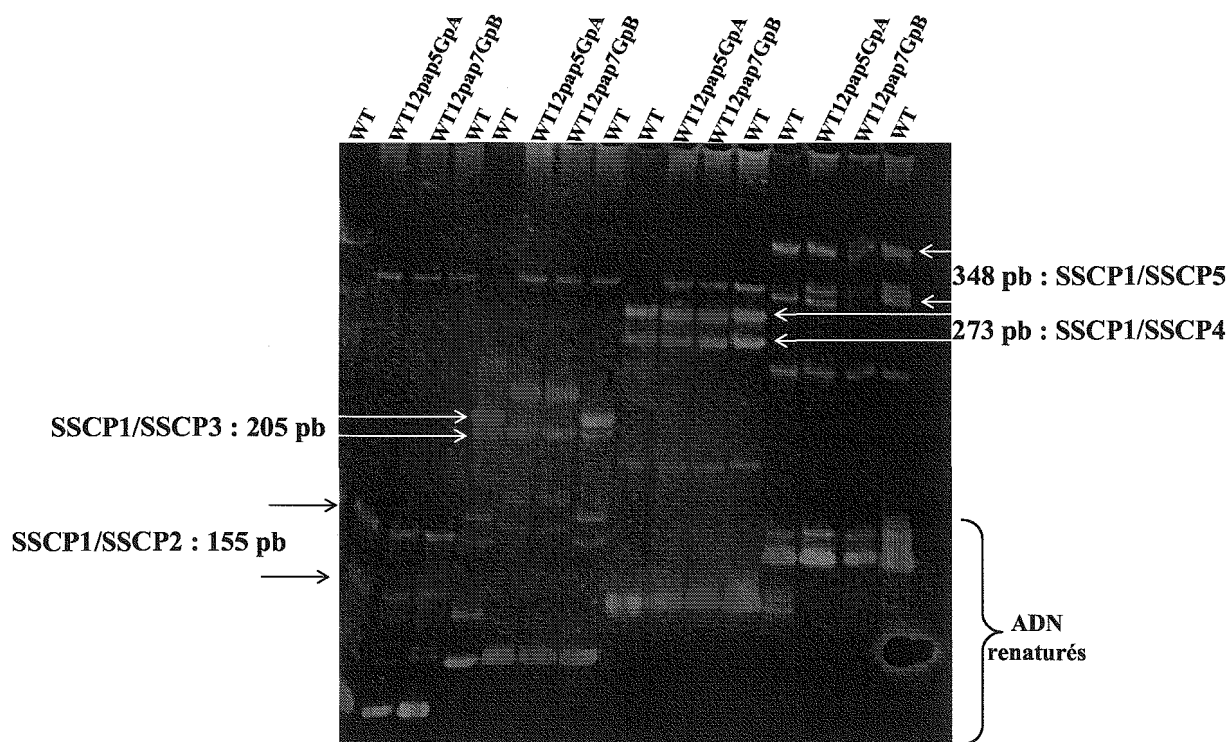


Figure 32 : Migration sur gel de polyacrylamide des fragments de PCR obtenus avec les couples d'oligonucléotides SSCP1/SSCP2, SSCP1/SSCP3, SSCP1/SSCP4 et SSCP1/SSCP5 à partir des ADN des souches M600, WT12pap5GpA et WT12pap7GpB. Les flèches indiquent les 2 monobrin correspondant à chaque produit d'amplification. Les bandes ayant migré le plus loin correspondent aux ADN renaturés. Les bandes non légendées pourraient correspondre à des produits aspécifiques.

Comme observé sur la figure 32, une différence de migration a été observée entre un des monobrin de 205 pb issu de l'ADN du transgène des 2 mutants présentant la mutation frameshift +1 et un des monobrin issu de l'ADN de la souche sauvage. Il est possible d'envisager que la modification de conformation provoquée par la présence d'une mutation sur l'autre monobrin n'est pas suffisante pour provoquer un changement de profil de migration. Pour les autres tailles testées, aucune différence de migration n'a été observée. Le couple d'oligonucléotides SSCP1/SSCP3 a donc été choisi pour la suite des expériences de SSCP.

L'ADN génomique des 10 mutants Pig⁻pap « HTC » de *S. ambofaciens* a été extrait et le fragment de 205 pb a été amplifié à l'aide du couple SSCP1/SSCP3. Les produits d'amplification obtenus ont été dénaturés et déposés sur gel de polyacrylamide (Figure 33).

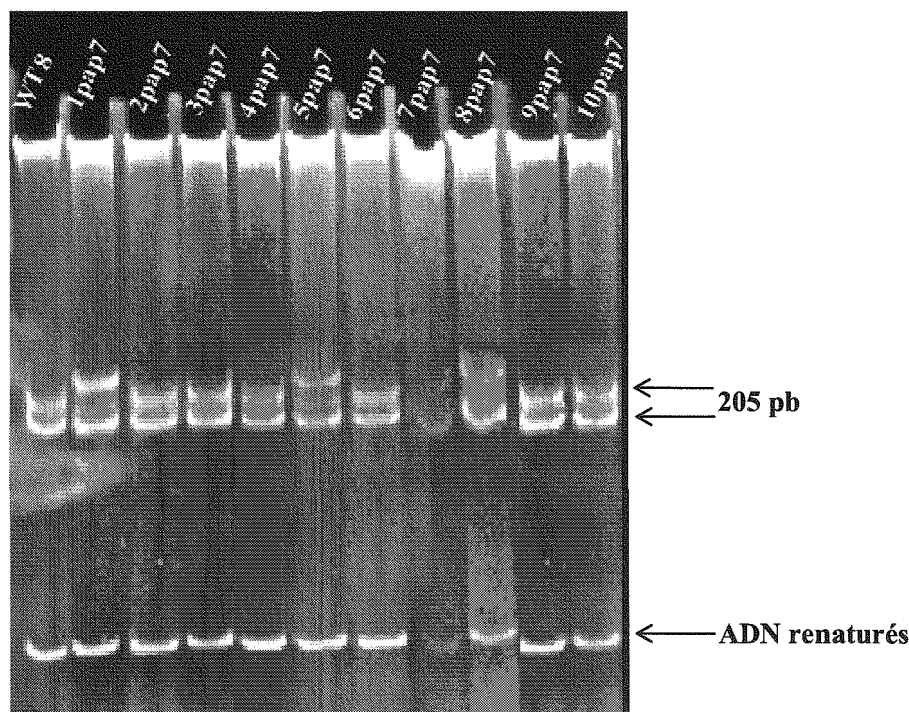


Figure 33 : Migration sur gel de polyacrylamide de fragments de PCR dénaturés de 205 pb. Ces fragments ont été obtenus avec le couple d'oligonucléotides SSCP1/SSCP3 en utilisant comme matrice l'ADN de la souche sauvage WT8 et de 10 mutants Pig⁻pap « HTC » de *S. ambofaciens*. La bande ayant migré le plus loin correspond aux ADN renaturés.

Sur les 10 mutants Pig⁻pap « HTC » de *S. ambofaciens* analysés, 4 présentaient un profil de migration des monobrinns différent de celui de la souche sauvage. Il s'agit des mutants 1pap7, 5pap7, 7pap7 et 8pap7. Afin de valider la fiabilité de ce type d'expérience, le fragment de 205 pb du gène *whiG* des mutants 5pap7 et 7pap7 a été séquencé et une mutation frameshift +1 consistant en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines a été détectée.

Ainsi, sur les plus de 1000 nucléotides constituant le gène *whiG* (promoteur et terminateur inclus), 4 mutants Pig⁻pap « HTC » sur les 10 analysés étaient mutés dans le fragment de 205 pb situé en 5' de l'ORF. Les autres pouvaient être mutés dans une autre partie du gène *whiG* ou appartenir à la catégorie des mutants non mutés et régulés de façon post-transcriptionnelle.

Comme aucune mutation dans le gène *whiG* n'avait encore été identifiée chez les mutants Pig_{pap} « HT » de *S. ambofaciens*, contrairement à ceux issus de milieux HTC, l'ADN génomique de 16 mutants « HT » a été extrait et le fragment de 205 pb a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides SSCP1/SSCP3. Les produits d'amplification obtenus ont été dénaturés et déposés sur gel de polyacrylamide. Sur les 16 mutants Pig_{pap} « HT » de *S. ambofaciens* analysés, 5 présentaient un profil de migration des monobrans différent de celui de la souche sauvage. Il s'agit des mutants 1papHT, 2papHT, 9papHT, 14papHT et 16papHT. Le fragment de 205 pb a été séquencé chez 3 de ces 5 mutants, 9papHT, 14papHT et 16papHT. Les 2 premiers présentaient le profil typique observé lors de l'insertion d'une cytosine dans la série de 6 cytosines en 5' de l'ORF *whiG*. Le mutant 16papHT présentait quant à lui un profil atypique, l'un des monobrans migrant plus loin que celui correspondant à la souche sauvage et l'autre monobrin migrant moins loin (Figure 34).

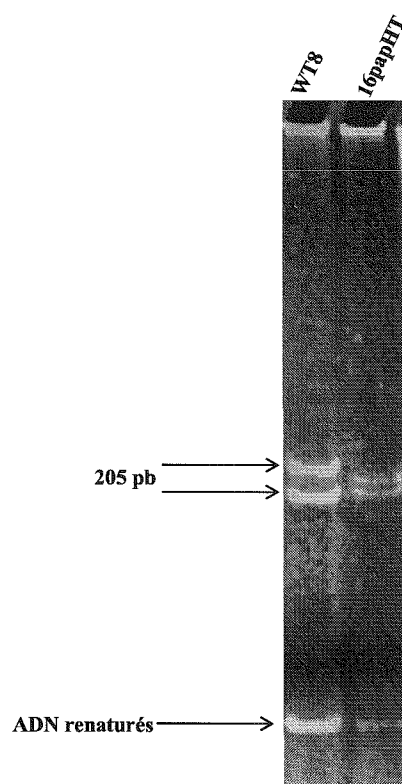


Figure 34 : Migration sur gel de polyacrylamide des fragments de PCR dénaturés de 205 pb. Ces fragments ont été obtenus en utilisant les oligonucléotides SSCP1/SSCP3 et comme matrice l'ADN de la souche sauvage WT8 et du mutant 16papHT. La bande ayant migré le plus loin correspond aux ADN renaturés.

L'analyse des séquences a révélé la présence de la mutation frameshift +1 consistant en l'insertion d'une cytosine dans la série de 6 cytosines chez le mutant 14papHT, conduisant à

l'apparition prématurée d'un codon stop (Figure 35). Le mutant 9papHT présentait, quant à lui, une mutation de type substitution se traduisant par le remplacement d'une adénine par une guanine, provoquant, d'un point de vue traductionnel, le remplacement d'une tyrosine par une cystéine dans la partie 3' de la région 1 de ce facteur σ (Figure 35). Enfin, le mutant 16papHT présentait une substitution d'une guanine en adénine en 5' de l'ORF, provoquant le remplacement d'un codon TGG en codon TGA et ainsi l'apparition prématurée d'un codon stop conduisant à la synthèse d'une protéine σ^{WhiG} probablement inactive puisque déléetée des régions 2.4 et 4.2 nécessaire à la reconnaissance des promoteurs qu'elle régule (Figure 35).

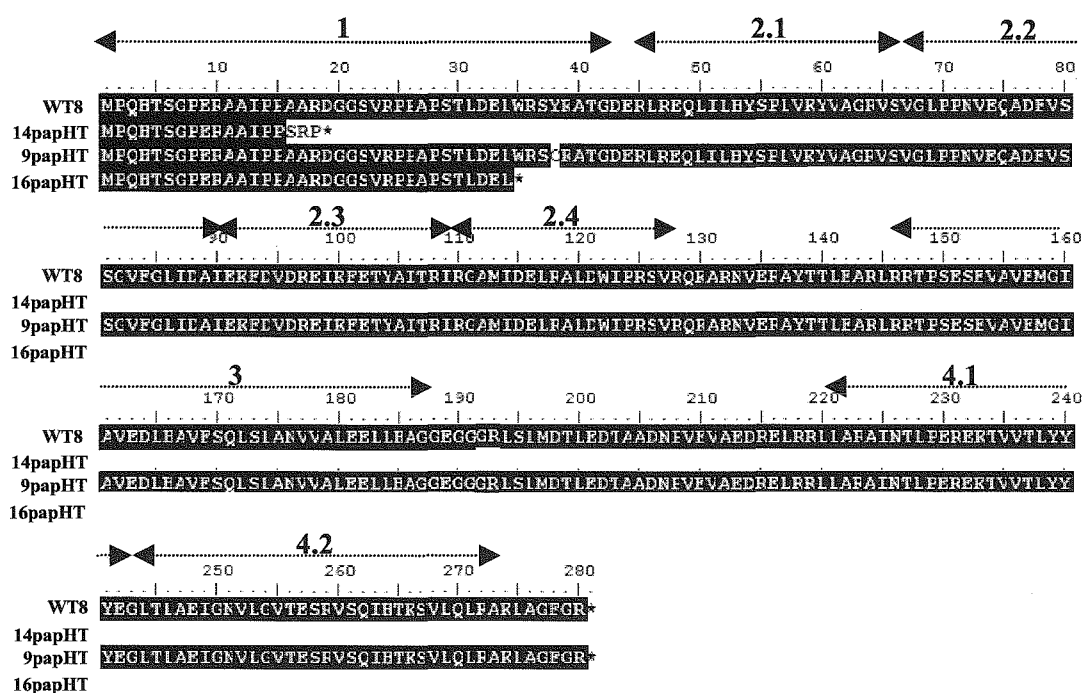


Figure 35 : Alignement de la séquence protéique de WhiG de WT8 et des 3 mutants Pig_{pap} « HT » 14papHT, 9papHT et 16papHT. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blanc sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de WT8 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Les régions caractéristiques des facteurs σ appartenant à la famille des facteurs σ^{70} sont indiquées par des double flèches.

Ainsi, alors qu'aucune mutation dans le gène *whiG* des mutants Pig_{pap} « HT » de *S. ambofaciens* n'avait été détectée lors de travaux antérieurs (Catakli *et al.*, 2005), une augmentation de l'échantillon et l'utilisation de la technique de SSCP ont permis de montrer que ce n'était pas le cas pour tous. En effet, 5 des 16 mutants Pig_{pap} « HT » étudiés et 4 des 10 mutants Pig_{pap} « HTC » analysés présentaient une mutation dans le fragment de 205 pb

en 5' du gène *whiG*. Les 17 autres mutants peuvent présenter une mutation à une autre position du gène *whiG* ou appartenir à la classe de mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* présentant une protéine WhiG inactive. Le ratio de mutants mutés et non mutés dans le fragment de 205 pb du gène *whiG* sur milieu complet HT et sur milieu limité en acides aminés HTC ne semble pas significativement différent, ce qui suggère que sur milieu limité en acides aminés, le nombre de mutants Pig⁻pap produits est plus important mais que leur nature par rapport au milieu complet n'est pas différente.

Ainsi, le gène *whiG* semble être fortement muté lors du développement des colonies de *S. ambofaciens*, ce qui se traduit par l'apparition de papilles blanches dans lesquelles ce gène est fréquemment muté. Chez cette espèce, 2 types de mutants Pig⁻pap ont été mis en évidence, ceux de la classe A, présentant une mutation dans leur gène *whiG*, et ceux de la classe B, présentant un gène *whiG* non muté mais une protéine WhiG vraisemblablement inactive peut-être suite à une modification post-transcriptionnelle. Le milieu de culture ne semble pas influencer la nature des mutants Pig⁻pap produits. Ainsi, comme le nombre de papilles produites est plus important sur un milieu limité en acides aminés, ce phénomène apparaît comme étant une amplification de ce qui se passe sur milieu HT. Les mutants Pig⁻pap pourraient donc être issus d'une baisse des ressources nutritives, celles-ci s'épuisant beaucoup plus rapidement sur milieu HTC que sur milieu HT.

2.2 Caractérisation de mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* issus de contextes nutritionnels différents

La caractérisation de 3 mutants Pig⁻pap « HT » de *S. coelicolor* et d'un mutant Pig⁻pap « HTC » a montré que ces mutants présentaient les mêmes caractéristiques que les mutants Pig⁻pap « HT » de *S. ambofaciens* (Catakli, 2004). Ces observations nous ont amenés à isoler un plus grand nombre de mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* afin de déterminer d'une part s'il existait chez cette espèce les 2 classes de mutants Pig⁻pap isolés chez *S. ambofaciens* et d'autre part si le milieu de culture à partir duquel ils étaient isolés influençait l'appartenance à l'une des 2 classes. Ainsi, 6 mutants Pig⁻pap « HT » (nommés 1cpHT à 6cpHT) et 7 mutants Pig⁻pap « HTC » (nommés 1cp7 à 7cp7) de *S. coelicolor* ont été isolés à partir de la souche M600 et caractérisés.

2.2.1 Caractérisation moléculaire de mutants Pig⁻pap *S. coelicolor* grâce à l'utilisation de la technique de SSCP

L'ADN génomique des 7 mutants Pig⁻pap « HTC » et des 6 mutants Pig⁻pap « HT » a été extrait et le fragment de 205 pb a été amplifié à l'aide du couple d'oligonucléotides SSCP1/SSCP3. Les produits d'amplification ont été dénaturés et déposés sur gel de polyacrylamide. Sur les 13 mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* analysés, aucun ne présentait un profil de migration d'un des 2, ou des 2 monobands de 205 pb, différent de celui de la souche sauvage M600, suggérant qu'aucune mutation n'était présente dans cette partie du gène *whiG*. Ces résultats contrastaient avec ceux trouvés pour *S. ambofaciens* puisque sur les 26 mutants Pig⁻pap analysés chez cette espèce, issus de milieu HT ou HTC, 9 présentaient un profil de migration différent de celui de la souche sauvage pour ce fragment de 205 pb.

2.2.2 Séquençage du gène *whiG* des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*

Le séquençage de la totalité du gène *whiG* (régions promotrice et terminatrice incluses) de 5 mutants Pig⁻pap « HTC » (1cp7 à 5cp7) a été réalisé de manière à savoir s'il existait un autre point chaud de mutation, différent de celui observé chez *S. ambofaciens*. L'analyse des séquences n'a révélé aucune mutation par rapport à la séquence du gène *whiG* de la souche sauvage M600 pour les 5 mutants analysés.

Ainsi, alors que deux types de mutants Pig⁻pap ont été mis en évidence chez *S. ambofaciens*, certains mutés dans le gène *whiG*, d'autres non mutés dans ce gène mais peut-être inactifs pour la protéine WhiG, aucun mutant Pig⁻pap muté dans ce gène n'a été identifié dans ce travail chez *S. coelicolor*. Ce résultat peut être interprété de 2 façons : soit tous les mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* appartiennent à la classe B, c'est-à-dire que le gène *whiG* n'est pas muté mais la protéine WhiG est inactive, soit le gène cible est différent entre les 2 espèces de *Streptomyces* étudiées.

2.2.3 Analyse transcriptionnelle du gène *whiH* chez les mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*

Afin de déterminer si la protéine WhiG des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* était active, nous avons analysé, par RT-PCR, la transcription du gène *whiH*, transcription directement dépendante d'un facteur σ^{WhiG} actif, chez 3 mutants Pig⁻pap « HTC ». Une extraction des ARN totaux a été réalisée sur des cultures de 2 jours à 30°C sur milieu HT solide de la souche sauvage M600 et de 3 mutants Pig⁻pap « HTC », 1cp7, 2cp7 et 3cp7. La transcription inverse a alors été réalisée selon le protocole décrit par Catakli *et al.* (2005) et les ADNc obtenus ont ensuite été utilisés pour une réaction de PCR classique en utilisant les oligonucléotides ^(trans)H1 et ^(trans)H2 permettant l'amplification d'un fragment de 150 pb interne à l'ORF *whiH* (ces oligonucléotides sont nommés H1 et H2 dans Catakli *et al.*, 2005) (Figure 36).

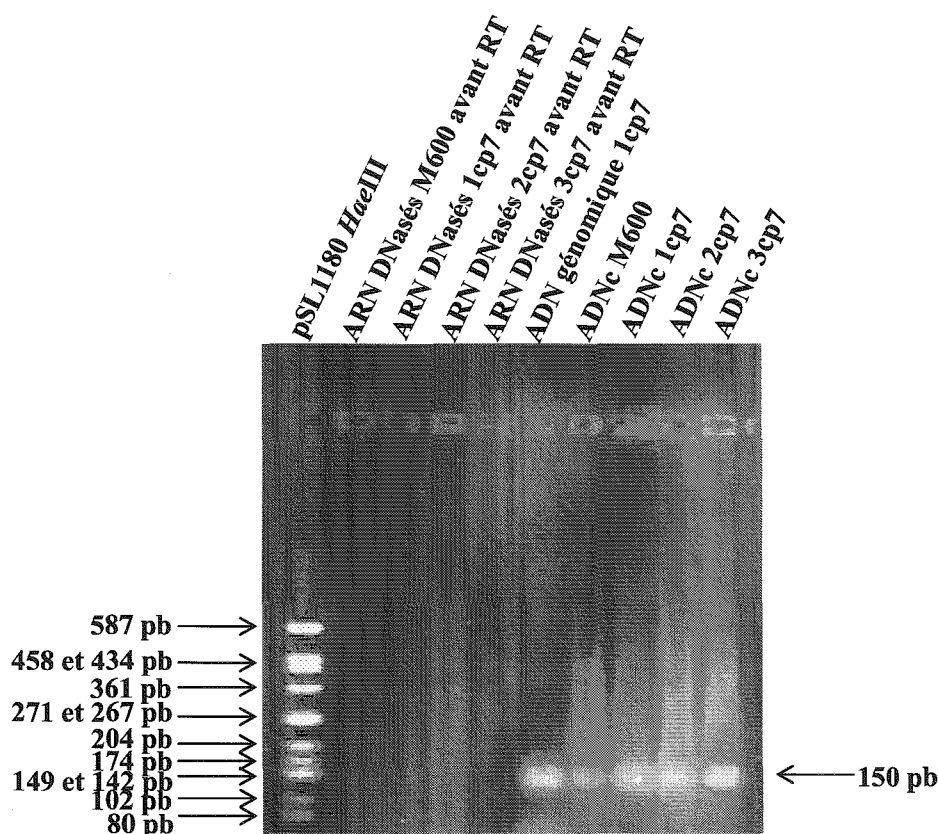


Figure 36 : Migration électrophorétique des produits de RT-PCR obtenus à l'aide du couple d'oligonucléotides ^(trans)H1/^(trans)H2 permettant l'amplification d'un fragment interne au gène *whiH*. L'ADN du plasmide pSL1180 digéré par *HaeIII* a été utilisé comme marqueur de taille. L'ADN génomique de la souche 1cp7 a été utilisé comme témoin positif de PCR. Les ARN traités à la DNase mais n'ayant pas subi de transcription inverse ont été utilisés comme matrice pour la réaction de PCR et ont servi de témoins négatifs.

L'observation du gel a révélé la présence d'un transcrit *whiH* chez la souche sauvage M600 et les 3 mutants analysés. Le signal était spécifique et ne correspondait pas à de l'ADN résiduel avant l'étape de transcription inverse puisque les pistes correspondant aux témoins négatifs réalisés, consistant en l'amplification grâce au couple d'oligonucléotides ^(trans)H1/^(trans)H2 des ARN traités à la DNase mais sans réaction de transcription inverse, ne présentaient aucun signal de transcription.

Ainsi, chez les mutants 1cp7, 2cp7 et 3cp7, le gène *whiH* est transcrit, suggérant que la protéine WhiG est fonctionnelle. Ce résultat contraste avec les observations réalisées chez *S. ambofaciens*, espèce chez laquelle 2 types de mutants Pig⁻pap ont été identifiés, des mutants mutés dans le gène *whiG*, et des mutants vraisemblablement inactifs pour la protéine WhiG puisque *whiH* n'y était pas transcrit.

2.2.4 Complémentation du phénotype Pig⁻pap chez *S. coelicolor*

Afin de déterminer quel gène était inactif chez ces mutants, les 5 gènes *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ* ont été introduits dans les 6 mutants Pig⁻pap « HTC » et les 7 mutants Pig⁻pap « HT » issus de la souche M600. Pour cela, une conjugaison entre les souches d'*E. coli* ET12567(pUZ8002) porteuses des plasmides pSET152, pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) ou pSET152(*whiJ*) et les 13 mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* a été réalisée. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu HT supplémenté en apramycine (30 µg/ml), résistance portée par le plasmide pSET152, et en acide nalidixique (50 µg/ml), qui permet de contre-sélectionner la souche donneuse.

Alors que l'introduction des plasmides pSET152, pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiH*) et pSET152(*whiJ*) n'a pas permis de compléter le phénotype mutant, l'introduction du plasmide pSET152(*whiG*) a permis un retour au phénotype sauvage chez les mutants 5cp7 et 6cpHT (Figure 37).

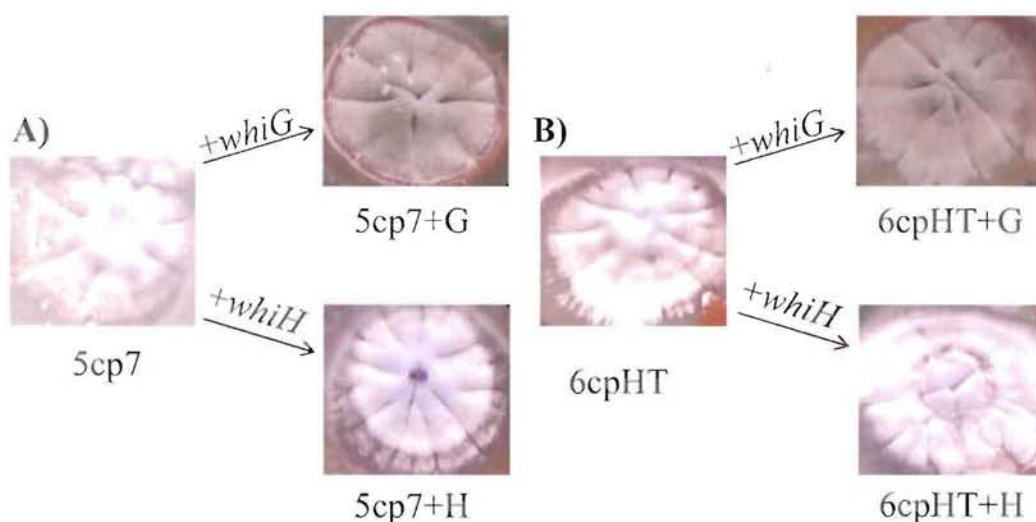


Figure 37 : Phénotypes des mutants Pig⁺pap 5cp7 (A) et 6cpHT (B) et des transconjugants 5cp7+G, 5cp7+H, 6cpHT+G et 6cpHT+H obtenus après introduction dans les 2 mutants Pig⁺pap des plasmides pSET152(*whiG*) et pSET152(*whiH*).

Pour les 11 autres mutants Pig⁺pap analysés, un retour au phénotype sauvage a été observé uniquement après introduction du plasmide pSET152(*whiH*), comme illustré pour 2 d'entre eux sur la figure 38.

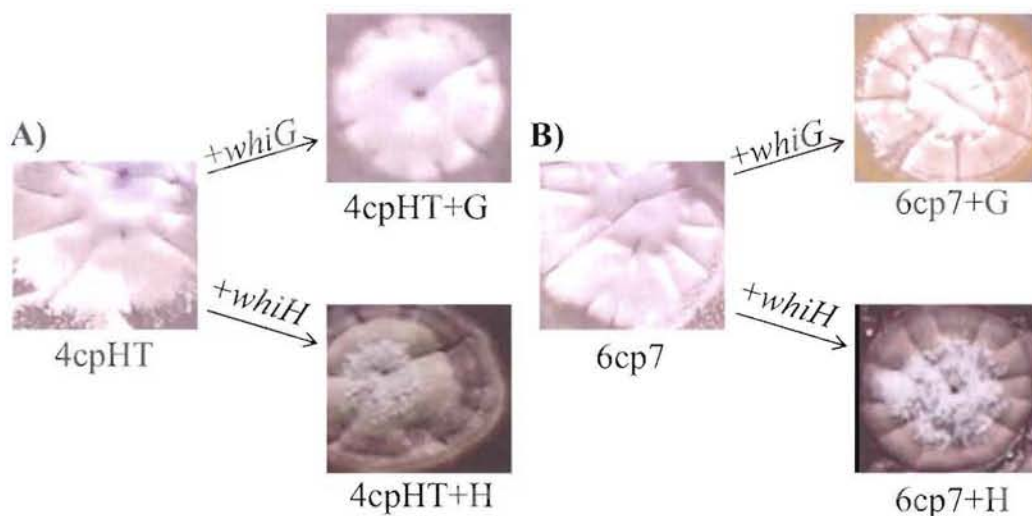


Figure 38 : Phénotypes des mutants Pig⁺pap 4cpHT (A) et 6cp7 (B) et des transconjugants 4cpHT+G, 4cpHT+H, 6cp7+G et 6cp7+H obtenus après introduction dans les 2 mutants Pig⁺pap des plasmides pSET152(*whiG*) et pSET152(*whiH*).

La présence du plasmide pSET152(*whiG*) chez 5cp7 et 6cpHT et du plasmide pSET152(*whiH*) chez les 11 autres mutants Pig⁺pap a été vérifiée par hybridation d'une sonde

correspondant respectivement à pSET152(*whiG*) et pSET152(*whiH*) sur les profils *Bam*HI des ADN génomiques des transconjugants.

2.2.5 Séquençage des gènes *whiG* et *whiH* chez les mutants Pig`pap de *S. coelicolor*

Le séquençage du gène *whiH* endogène a alors été entrepris chez les 11 mutants Pig`pap complémentés par pSET152(*whiH*). Pour cela, 3 couples d'oligonucléotides ont été dessinés afin d'amplifier la totalité du gène *whiH*, régions promotrice et terminatrice incluses. Ces couples ont été nommés H1/H2, H3/H4 et H5/H6 (Figure 39).

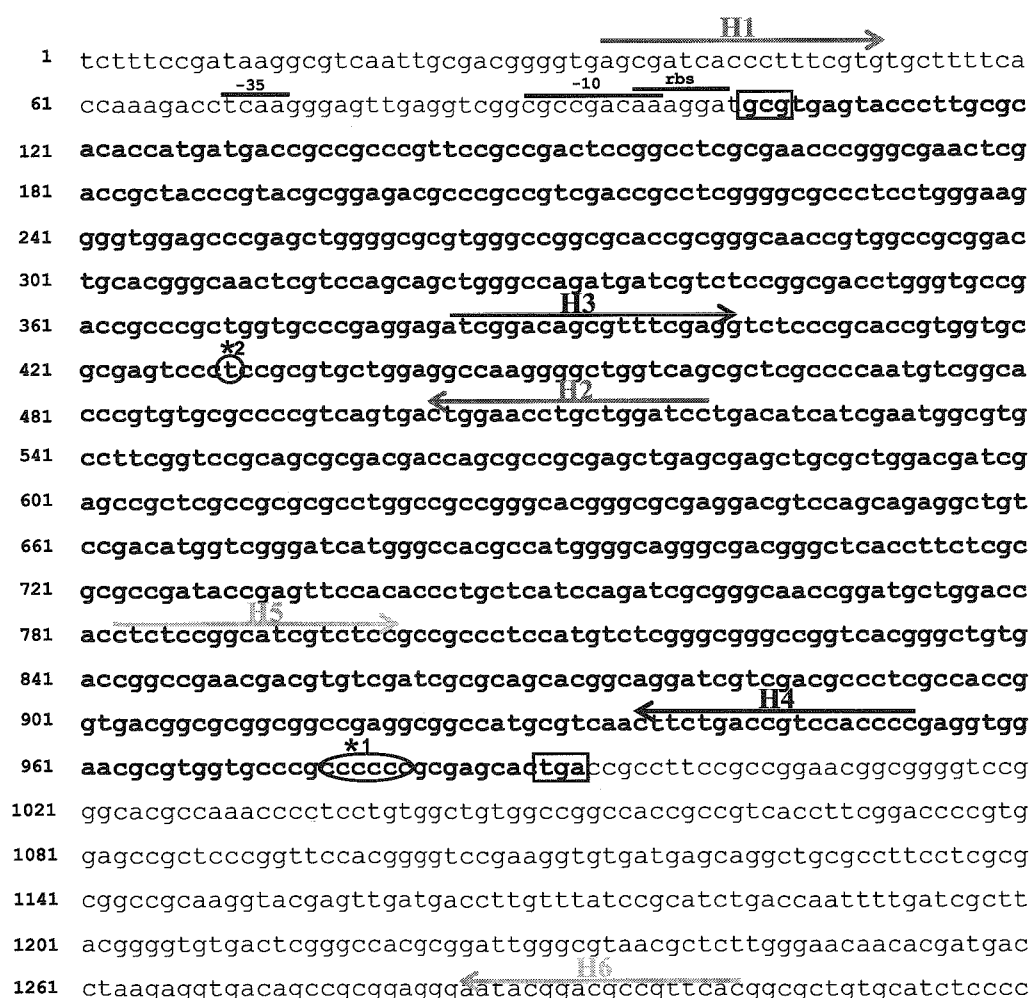


Figure 39 : Séquence du gène *whiH* de *S. coelicolor* M600 et localisation des oligonucléotides (marqués par des flèches) utilisés pour amplifier puis séquencer les différentes portions de ce gène. Les boîtes promotrices -35 et -10 et la séquence rbs sont indiquées. Les codons start et stop sont encadrés. Les séquences entourées correspondent aux endroits où des mutations ont été détectées dans les mutants Pig`pap de *S. coelicolor*. Elles sont notées *1 pour celle retrouvée chez 10 des 11 mutants analysés et *2 pour 6cp7.

L'analyse des séquences obtenues a permis de révéler dans tous les cas la présence d'une mutation dans l'ORF *whiH*. Dix des 11 mutants Pig⁻pap analysés présentaient la même mutation, consistant en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines en 3' de l'ORF (position 976, figure 39). Cette mutation provoquait un décalage du cadre de lecture se traduisant d'un point de vue protéique par la disparition du codon stop sauvage et la synthèse d'une protéine WhiH plus longue de presque 100 acides aminés (Figure 40). WhiH appartient à la sous-famille FadR des régulateurs GntR dont la majorité agirait sous forme de dimère, dimérisation impliquant vraisemblablement l'extrémité C-terminale (Rigali *et al.*, 2002). Si WhiH agit sous forme de dimère, il est possible d'envisager que la protéine WhiH soit inactive chez ces 10 mutants Pig⁻pap car incapable de se dimériser par son extrémité C-terminale. WhiH est un répresseur transcriptionnel et il agirait sur sa propre transcription (Ryding *et al.*, 1998). Ainsi, un mutant *whiH* présente un taux de transcrit pour ce gène plus important que celui de la souche sauvage. Une analyse du taux de transcription, par PCR quantitative, pourrait permettre de confirmer le caractère non fonctionnel de la protéine WhiH chez ces 10 mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*.

Le 11^{ème} mutant, 6cp7, présentait quant à lui une substitution d'une thymine en cytosine localisée en 5' du gène (position 430, figure 39). Cette mutation provoquait la modification d'une Sérine en Proline dans le motif Hélice-Tour-Hélice permettant la liaison de WhiH à l'ADN (Figure 40). La protéine WhiH de ce mutant pourrait donc être moins active voire inactive puisqu'incapable de se fixer au niveau des gènes qu'elle régule.

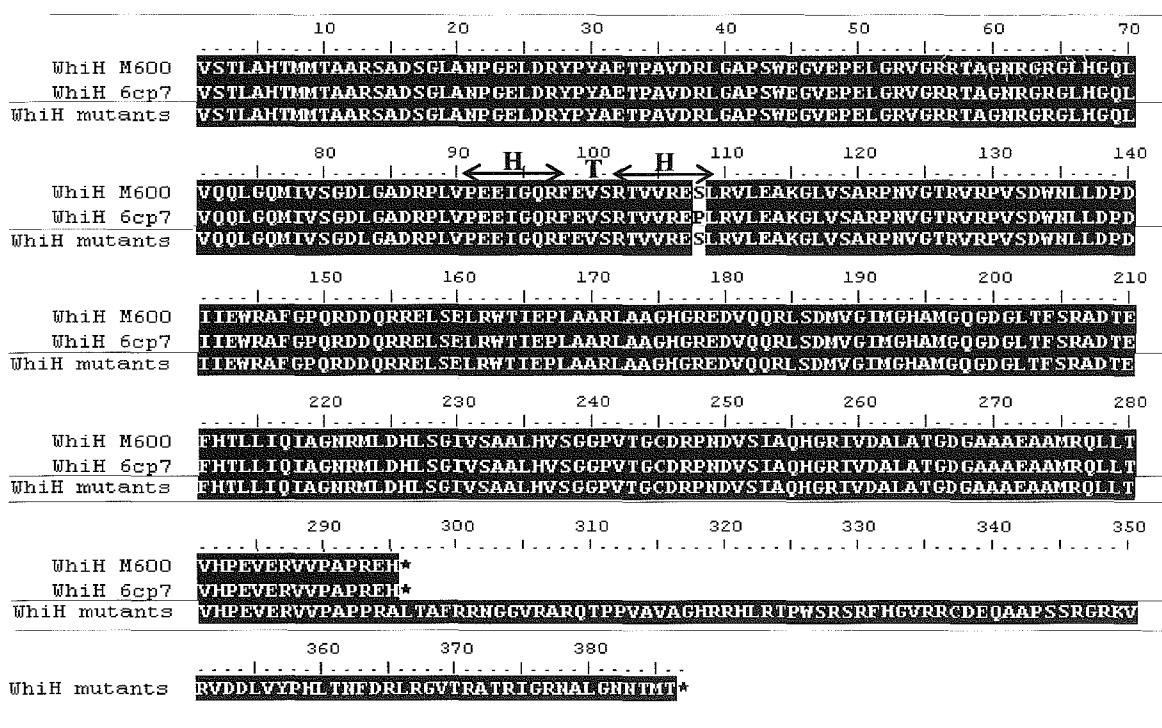


Figure 40 : Alignement de la séquence protéique de WhiH de M600 et des mutants Pig_{pap} de *S. coelicolor* complémentables par pSET152(*whiH*). « WhiH mutants » désigne les 10 mutants présentant la même mutation en 3' de l'ORF. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blancs sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de M600 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Le motif Hélice(H)-Tour(T)-Hélice(H) caractéristique des régulateurs GntR est indiqué.

Le séquençage du gène *whiG* a été réalisé chez les 2 mutants Pig_{pap} complémentés après introduction du plasmide pSET152(*whiG*). Cette analyse a permis de montrer que le mutant 6cpHT présentait une mutation de type frameshift -1 consistant en la délétion d'une cytosine dans une série de 4 cytosines dès le début de l'ORF (position 221, figure 41).



Figure 41 : Séquence du gène *whiG* de *S. coelicolor* M600 et localisation des oligonucléotides (marqués par des flèches) utilisés pour amplifier puis séquencer les différentes portions de ce gène. Les codons start et stop sont encadrés. La séquence entourée et marquée d'un astérisque correspond à la série de 4 cytosines dans laquelle a été identifiée une mutation chez le mutant 6cpHT.

Cette mutation provoquait la synthèse d'une protéine aberrante et dépourvue des régions 2.4 et 4.2 (Figure 42). Cette protéine pourrait donc vraisemblablement être inactive.

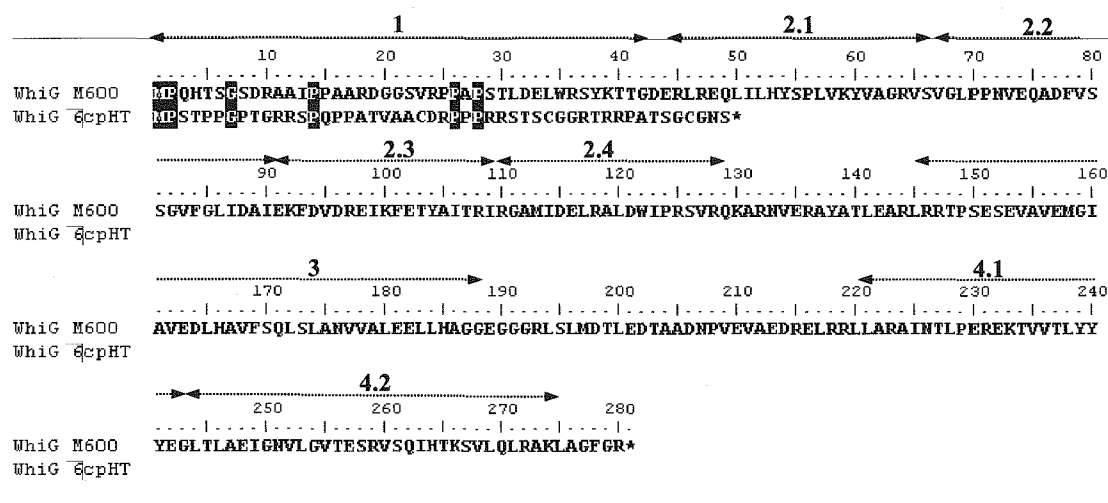


Figure 42 : Alignement de la séquence protéique de WhiG de M600 et du mutant 6cpHT. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blanc sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de M600 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Les régions caractéristiques des facteurs σ appartenant à la famille des facteurs σ^{70} sont indiquées par des double flèches.

En revanche, aucune mutation n'a été détectée chez le mutant 5cp7 par rapport à la séquence sauvage. Afin de déterminer si la protéine WhiG de ce mutant était active, nous avons analysé la transcription du gène *whiH* par RT-PCR chez ce mutant. Comme illustré sur la figure 43, un transcrit *whiH* a été détecté, suggérant la présence d'une protéine WhiG active chez ce mutant, alors qu'il ne l'était pas chez le mutant 6cpHT, analysé pour comparaison.

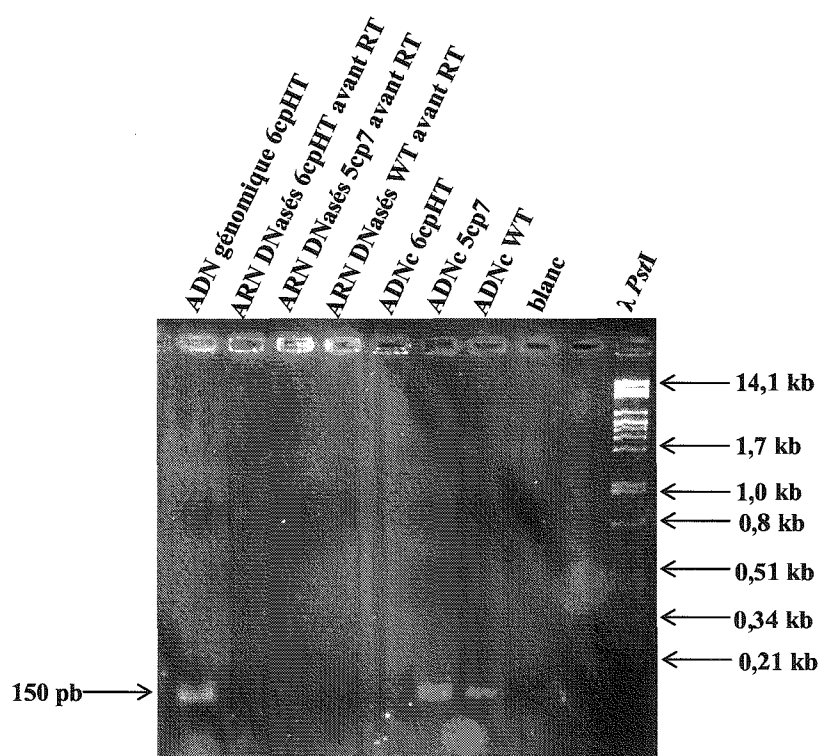


Figure 43 : Migration électrophorétique des produits de RT-PCR obtenus à l'aide du couple d'oligonucléotides (trans)H1/(trans)H2 permettant l'amplification d'un fragment interne au gène *whiH*. L'ADN du phage λ digéré par *PstI* a été utilisé comme marqueur de taille. L'ADN génomique de la souche 6cpHT a été utilisé comme témoin positif de PCR. Les ARN traités à la DNase mais n'ayant pas subi de transcription inverse ont été utilisés comme matrice pour la réaction de PCR et ont servi de témoins négatifs. La piste « blanc » correspond à un échantillon contenant de l'eau à la place des ADNc.

Le séquençage du gène *whiH* de ce mutant a été réalisé et aucune différence par rapport à la séquence du gène *whiH* de la souche sauvage M600 n'a été détectée.

Ce type de résultats n'ayant encore jamais été observé ni chez les mutants Pig pap de *S. ambofaciens* ni chez ceux de *S. coelicolor*, la recherche de spores sauvages résiduelles a été entreprise. Pour cela, un grand nombre de colonies du mutant 5cp7, ainsi que des mutants 1cp7 à 4cp7, pour comparaison, a été observé après 7 jours de croissance à 30°C sur milieu HT. Alors qu'aucune colonie grise n'a été détectée pour les mutants 1cp7, 2cp7, 3cp7 et 4cp7 après observation respectivement de 7128, 6545, 6123 et 5978 colonies, 491 colonies grises étaient présentes parmi les 5053 colonies du mutant 5cp7 étalées, ce qui représente un taux de 10 % environ.

Ainsi, alors que le phénotype mutant de 1cp7, 2cp7, 3cp7 et 4cp7 semble stable (taux de réversion inférieur à $1,7.10^{-4}$), le mutant 5cp7 présente un fort pourcentage de colonies de phénotype sauvage. Il est probable que ce mutant soit en fait un hétéroclone, mélangeant encore des chromosomes sauvages, interférant avec la séquence du génome mutant.

Ainsi, la quasi-totalité des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*, sinon tous, qu'ils soient issus de milieu HT ou HTC, présente une mutation dans le gène *whiH* (dans 10 cas sur 11) ou dans le gène *whiG* (dans 1 cas sur 11). Cette observation diffère de celle réalisée sur les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens*, pour lesquels la protéine WhiG semble toujours inactive, que ce soit par un événement mutationnel dans le gène ou par une modification post-transcriptionnelle. Afin de détecter la présence éventuelle de mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* mutés dans le gène *whiH*, l'introduction du plasmide pSET152(*whiG*) ou pSET152(*whiH*) a été réalisée dans tous les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* qui présentaient, en SSCP, un profil de migration des 2 monobrs d'ADN identique à celui de la souche sauvage. Des transconjugants de phénotype sauvage ont été obtenus après introduction du plasmide pSET152(*whiG*) dans tous les mutants analysés, alors que des transconjugants de phénotype Pig⁻pap étaient observés après introduction du plasmide pSET152(*whiH*). Ainsi, à l'heure actuelle, aucun mutant Pig⁻pap de *S. ambofaciens* déficient dans le gène *whiH* n'a été isolé.

Malgré cette différence, les mutants Pig⁻pap des 2 espèces présentent de nombreuses caractéristiques communes que sont la dépigmentation, l'incapacité à sporuler, l'absence de grand réarrangement génomique et la stabilité du phénotype mutant. Les gènes *whiG* et *whiH* intervenant dans la cascade de sporulation semblent être des cibles de l'instabilité génétique lors d'une limitation en acides aminés, avec une préférence ciblée sur *whiH* chez *S. coelicolor* et sur *whiG* chez *S. ambofaciens*.

3 La réponse stringente est impliquée dans la production de mutants Pig⁻pap

La réponse stringente est une réponse physiologique qui se met en place notamment lors d'une limitation en acides aminés. L'observation d'un plus grand nombre de papilles sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* lors d'une limitation en acides aminés nous a amenés à nous interroger sur l'implication de cette réponse cellulaire dans la production de papilles blanches et donc dans l'augmentation de la mutabilité des gènes *whiG* et *whiH* lors du développement. Afin de tester cette hypothèse, la capacité d'un mutant *relA* de *S. coelicolor* (Chakraburttty and Bibb, 1997) à produire des papilles a été déterminée. Dans ce mutant, qui dérive de la souche sauvage M600, une grande partie du gène *relA*, dont celle codant l'activité synthétase, a été remplacée par une cassette de résistance à l'hygromycine. Ce mutant est incapable de produire du (p)ppGpp en réponse à une carence en acides aminés.

3.1 Le mutant *relA* M570 ne produit pas de papilles

Dans un premier temps, le mutant M570 et la souche sauvage M600 ont été cultivés à 30°C sur milieux HT, HTC7 et HTC7+aa et leur phénotype a été observé à différents temps de croissance. Le mycélium aérien du mutant M570 semblait moins développé que celui de la souche sauvage M600, surtout lors des premiers jours de sa croissance, que ce soit sur milieu HT, HTC7 ou HTC7+aa. Afin de vérifier que le mutant M570 n'était pas déficient dans la formation de mycélium aérien et de spores, une coloration de Gram a été réalisée à 5 jours et 14 jours de croissance sur des fragments de colonies du mutant M570 et de la souche sauvage M600 cultivées sur milieux HT, HTC7 et HTC7+aa. Alors que la souche M570 semblait qualitativement produire moins de spores que la souche sauvage M600 après 5 jours de croissance, à 14 jours, c'est-à-dire lors de l'établissement des distributions du npc, une grande majorité de spores était observée chez le sauvage comme chez le mutant, permettant de conclure que l'absence de papilles chez la souche M570, si tel était le cas, n'était pas due à un blocage dans la formation du mycélium aérien et des spores.

Le mutant *relA* M570 a ainsi été cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieux HT, HTC7 et HTC7+aa. Qu'il soit cultivé sur milieu riche en acides aminés, comme le sont les milieux

HT et HTC7+aa, ou pauvre en acides aminés, ce qui est le cas du milieu HTC7, milieu sur lequel la souche sauvage présentait un très grand nombre de papilles, le mutant *relA* M570 ne présentait pas, ou très peu, de papilles (Figure 44).

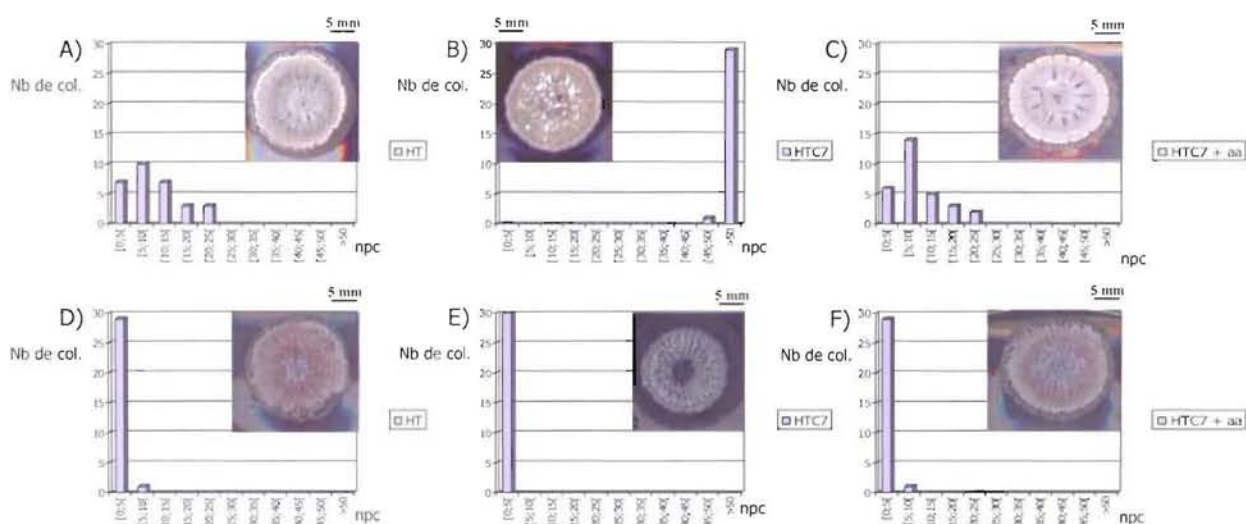


Figure 44 : Représentation graphique de la distribution du npc observée chez la souche sauvage *S. coelicolor* M600 et le mutant *relA* M570 dérivant de cette souche, cultivés sur milieu HT (A et D), HTC7 (B et E) et HTC7+aa (C et F) 14 jours à 30°C. Sur chaque milieu, 30 colonies aléatoirement choisies ont été observées et les différentes valeurs du npc regroupées par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie du phénotype le plus représenté a été choisie.

3.2 Complémentation du mutant *relA* M570

Afin de confirmer l'implication de la réponse stringente et plus directement du (p)ppGpp dans la production de papilles chez *S. coelicolor*, le mutant *relA* M570 a été complémenté en introduisant le plasmide pIJ6084 (Sun *et al.*, 2001). Ce plasmide, dérivé de pIJ8600, porte un gène de résistance au thiostrepton et à l'apramycine, une origine de transfert permettant son transfert par conjugaison intergénérique *E. coli*/*Streptomyces*, le site *attP* du phage Φ C31 et le gène codant l'intégrase (comme le plasmide pSET152, le maintien du plasmide pIJ6084 dans *Streptomyces* dépend de son intégration site-spécifique au niveau du site *attB* du génome) et une grande partie du gène *relA*, notamment celle codant l'activité (p)ppGpp synthétase, sous le contrôle d'un promoteur inducible au thiostrepton (*tipA*) (Figure 45).

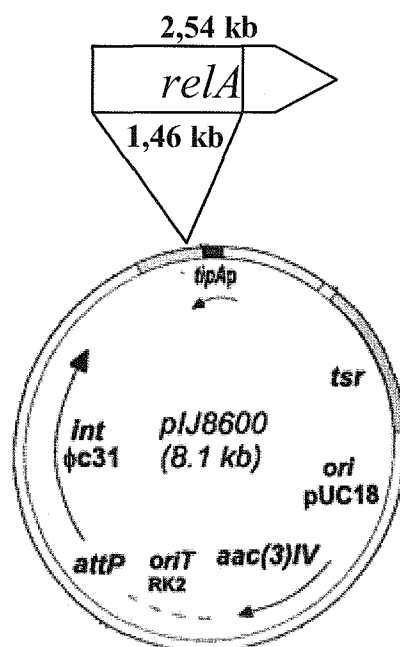


Figure 45 : Représentation schématique du plasmide pIJ8600 dans lequel a été cloné un fragment de 1,46 kb du gène *relA* portant l'activité (p)ppGpp synthétase. Le promoteur *tipA* (*tipAp*), le gène de résistance au thiostrepton (*tsr*), l'origine de réplication de pUC18 (*ori pUC18*), le gène de résistance à l'apramycine (*aac(3)IV*), l'origine de transfert du plasmide RK2 (*oriT RK2*), le site d'attachement du phage Φ C31 (*attP*) et le gène codant l'intégrase du phage Φ C31 (*int* Φ C31) sont indiqués (d'après Sun *et al.*, 1999 et Sun *et al.*, 2001). La taille du gène *relA* et du fragment cloné est spécifiée.

Le placement sous le contrôle d'un promoteur inductible permet d'induire à un moment donné la synthèse de (p)ppGpp. Il est à noter que l'induction précoce de ce gène lors du développement (inférieur à 2 jours) ne doit pas se faire car elle entraîne une létalité. En effet, l'accumulation de (p)ppGpp provoque l'inhibition de nombreux processus métaboliques tels que la synthèse d'ADN et d'ARN ribosomiaux et conduit à l'impossibilité de former une colonie s'il est exprimé dans les toutes premières étapes du processus de développement (Sun *et al.*, 2001).

Le plasmide pIJ6084 a donc été introduit dans le mutant M570 par conjugaison intergénérique *E. coli* ET12567(pUZ8002)/*S. coelicolor*. Trois transconjugants ont été aléatoirement choisis et analysés. Il s'agit des souches M570_{pIJ6084}[1], M570_{pIJ6084}[2] et M570_{pIJ6084}[3]. L'analyse de leur profil *AseI*, par PFGE, a révélé l'absence du fragment *AseI* comportant le site *attB* du phage Φ C31 et la présence de 2 fragments supplémentaires par rapport à la souche sauvage M600, attestant de l'intégration du plasmide pIJ6084 dans leur

génomique. En effet, le plasmide pIJ6084 porte un site de restriction *AseI*. L'hybridation de ce plasmide marqué sur des profils de restriction *BamHI* et *AseI* de l'ADN génomique des 3 transconjugants obtenus respectivement par électrophorèse classique et par PFGE a confirmé sa présence au niveau du site *attB*. Après 72 heures de croissance à 30°C des transconjugants sur milieux HT et HTC7, des disques, imbibés de 12 µl d'une solution de thiostrepton à 1 µg/µl, ont été déposés à proximité de colonies. Des expériences témoins ont été réalisées en parallèle, en introduisant le plasmide pIJ8600 dans le mutant M570 (souche nommée M570_{pIJ8600}) et en induisant de la même manière que précédemment le promoteur *tipA*. De même, la souche M570, sans plasmide, a subi un traitement au thiostrepton comme décrit précédemment. Après 11 jours supplémentaires (après traitement au thiostrepton) de croissance à 30°C, 30 colonies aléatoirement choisies des 3 transconjugants, de la souche M570_{pIJ8600} et de la souche M570 traitée au thiostrepton ont été observées sur chaque milieu et le nombre de papilles par colonie a été déterminé.

Comme illustré figure 46, les colonies de M570_{pIJ8600} traitées au thiostrepton (Figure 46B) ne présentaient pas (ou très peu) de papilles, comme celles sans induction (Figure 46A), montrant que le plasmide pIJ8600 à lui tout seul ne permettait pas le retour à la production de papilles après traitement au thiostrepton. De même, les colonies du mutant M570 ne produisaient pas (ou très peu) de papilles sans (Figure 46C) ou avec (Figure 46D) traitement au thiostrepton, montrant que le thiostrepton à lui tout seul ne permettait pas le retour à la production de papilles.

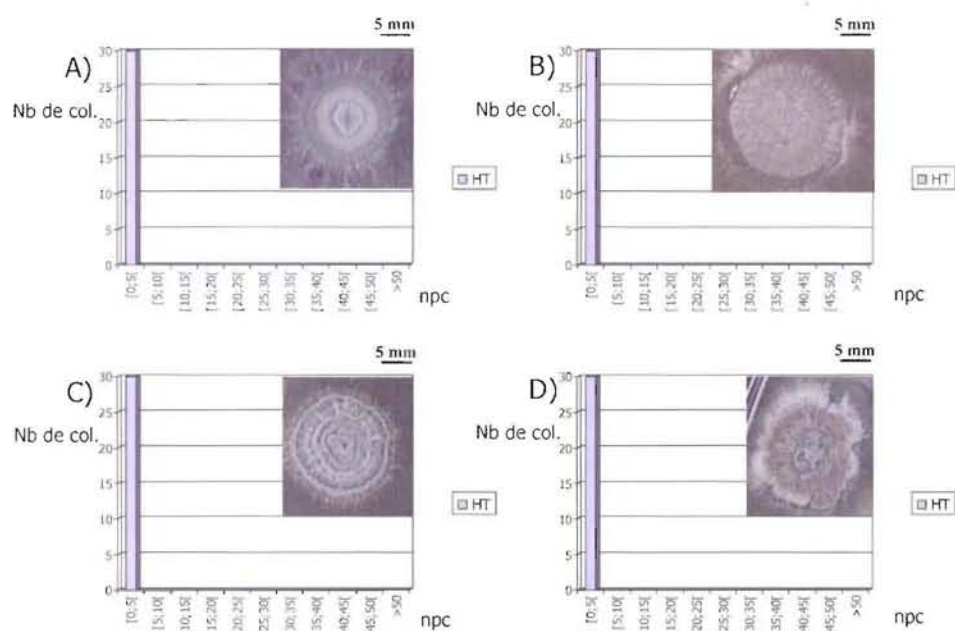


Figure 46 : Représentation graphique de la distribution du npc observée après 14 jours de croissance à 30°C sur milieu HT de la souche *S. coelicolor* M570_{pIJ8600} (A et B) et M570 (C et D) après traitement au thiostrepton (12 µl d'une solution à 1 µg/µl) (B et D) ou sans traitement (A et C). Sur chaque milieu, 30 colonies ont été observées et les différentes valeurs du npc regroupées par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie du phénotype le plus représenté a été choisie.

Les distributions établies étant similaires pour les 3 transconjugants M570_{pIJ6084}[1], M570_{pIJ6084}[2] et M570_{pIJ6084}[3], seules celles obtenues pour M570_{pIJ6084}[1] sont présentées sur la figure 47.

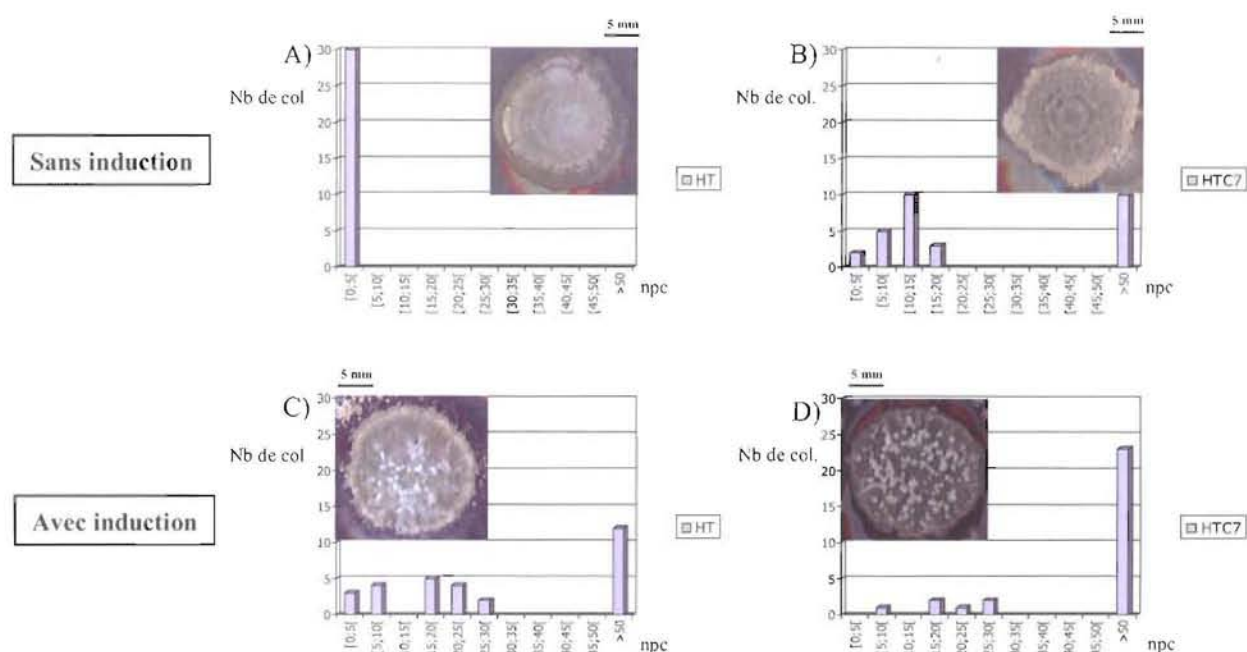


Figure 47 : Représentation graphique de la distribution du npc observée après 14 jours de croissance à 30°C de la souche *S. coelicolor* M570_{pIJ6084}[1] cultivée sur milieu HT (A et C) et HTC7 (B et D) après induction de la synthèse de (p)ppGpp par 12 µl d'une solution de thiostrepton à 1 µg/µl (C et D) ou sans induction (A et B). Sur chaque milieu, 30 colonies ont été observées et les différentes valeurs du npc regroupées par classe de 5. Le nombre de colonies observées pour chaque classe est représenté en ordonnée (Nb de col.). Une photographie du phénotype le plus représenté a été choisie.

L'induction de la synthèse de (p)ppGpp provoque l'augmentation du nombre de papilles, sur les colonies cultivées sur milieu HT (Figure 47C) comme sur celles cultivées sur milieu HTC7 (Figure 47D), puisque la majorité des colonies présentait plus de 50 papilles, ce qui n'était pas le cas sans induction (Figure 47A et B), condition dans laquelle la majorité des colonies présentait moins de 20 papilles. Cependant, il est à noter que certaines colonies présentaient un grand nombre de papilles sur HTC7 même sans induction du promoteur *tipA*. Ceci pourrait être expliqué par une transcription résiduelle au niveau du promoteur *tipA* ou d'un promoteur en amont (Sun *et al.*, 2001).

Ainsi, l'introduction du plasmide pIJ6084 et l'induction de l'activité (p)ppGpp synthétase chez le mutant M570 permettent un retour à la production de papilles dépigmentées à la surface des colonies, confirmant l'implication de la réponse stringente et du (p)ppGpp dans la mutabilité chez *S. coelicolor*.

3.3 Caractérisation de mutants Pig⁻pap issus de complémentants

Afin de vérifier que les papilles produites à la surface des colonies des 3 complémentants M570_{pIJ6084}[1], M570_{pIJ6084}[2] et M570_{pIJ6084}[3] après traitement au thiostrepton donnaient naissance à des mutants Pig⁻pap de même nature moléculaire que ceux caractérisés précédemment, trois papilles ont été repiquées (une pour chaque complémentant) et les trois mutants Pig⁻pap en dérivant, nommés M570_{pIJ6084}[1]pap, M570_{pIJ6084}[2]pap et M570_{pIJ6084}[3]pap analysés.

L'observation de ces mutants a montré qu'ils étaient dépigmentés. Une coloration de Gram réalisée sur des fragments de colonies, cultivées pendant 7 jours à 30°C sur milieu HT, n'a révélé que des fragments mycéliens, suggérant que ces mutants étaient incapables de produire des spores. Le séquençage des gènes *whiG* ou *whiH* a révélé que ces mutants Pig⁻pap étaient mutés dans un de ces 2 gènes. En effet, le mutant M570_{pIJ6084}[1]pap présentait une mutation de type frameshift -1 provoquant un décalage du cadre de lecture (position 857, figure 48) et la synthèse d'une protéine WhiH dont la partie C-terminale était totalement modifiée (Figure 49). Il est ainsi possible d'envisager que la protéine WhiH de M570_{pIJ6084}[1]pap ne soit plus active car plus capable de se dimériser *via* son extrémité C-terminale.

Le mutant M570_{pIJ6084}[3]pap présentait l'insertion d'une cytosine en + dans la série de 6 cytosines en 3' de l'ORF précédemment observée dans le gène *whiH* de 10 mutants Pig⁻pap isolés de la souche sauvage M600 (cf. paragraphe 2.2.5) (position 976, figure 48). Cette mutation provoquait la disparition du codon stop sauvage et la synthèse d'une protéine WhiH plus longue de presque 100 acides aminés (Figure 49).

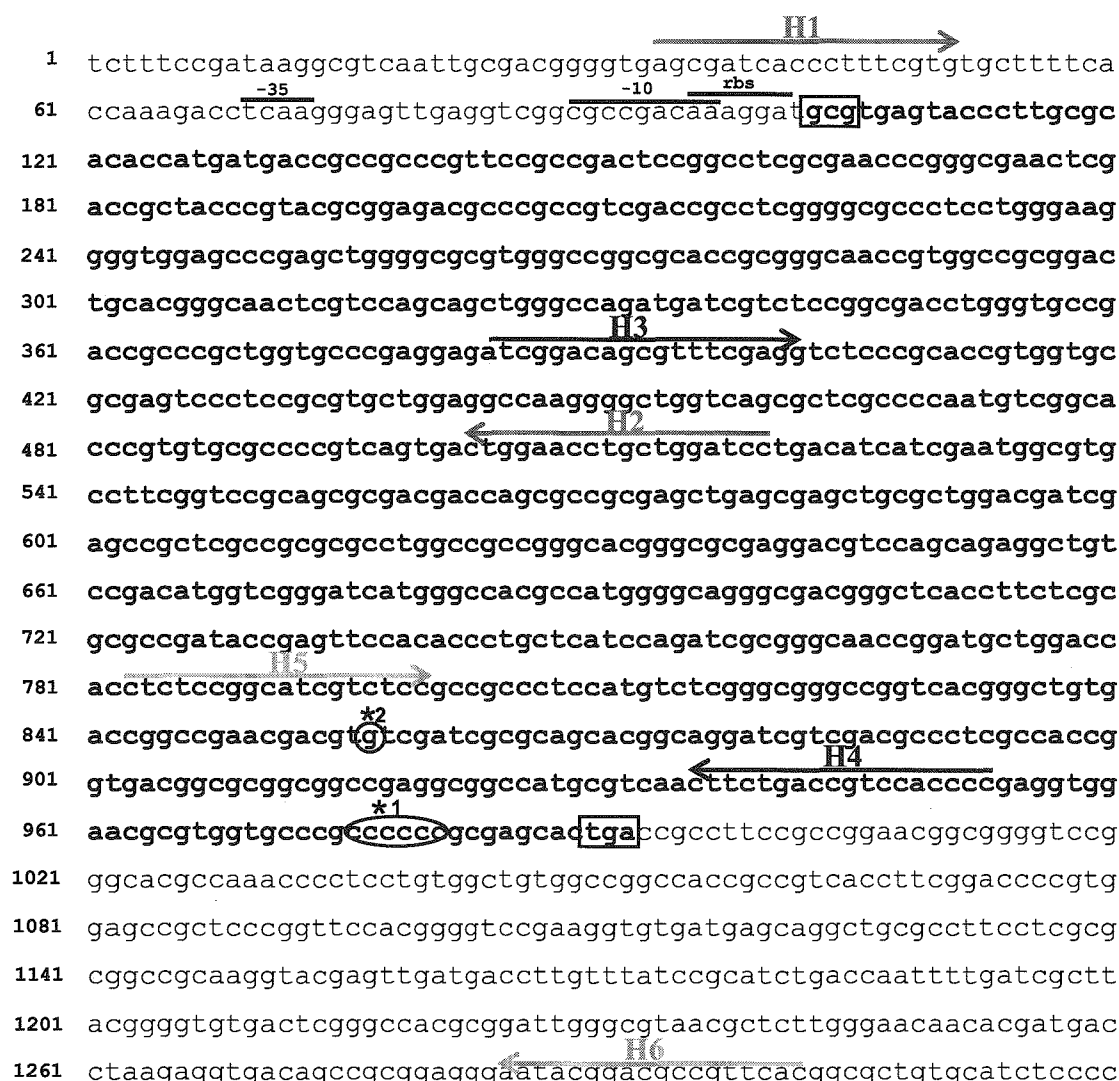


Figure 48 : Séquence du gène *whiH* de *S. coelicolor* et localisation des oligonucléotides (marqués par des flèches) utilisés pour amplifier puis séquencer les différentes portions de ce gène. Les boîtes promotrices -35 et -10 et la séquence rbs sont indiquées. Les codons start et stop sont encadrés. Les séquences entourées correspondent aux endroits où des mutations ont été détectées dans les mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*. Elles sont notées *1 pour celle retrouvée chez M570_{pU6084}[3] et *2 pour M570_{pU6084}[1].

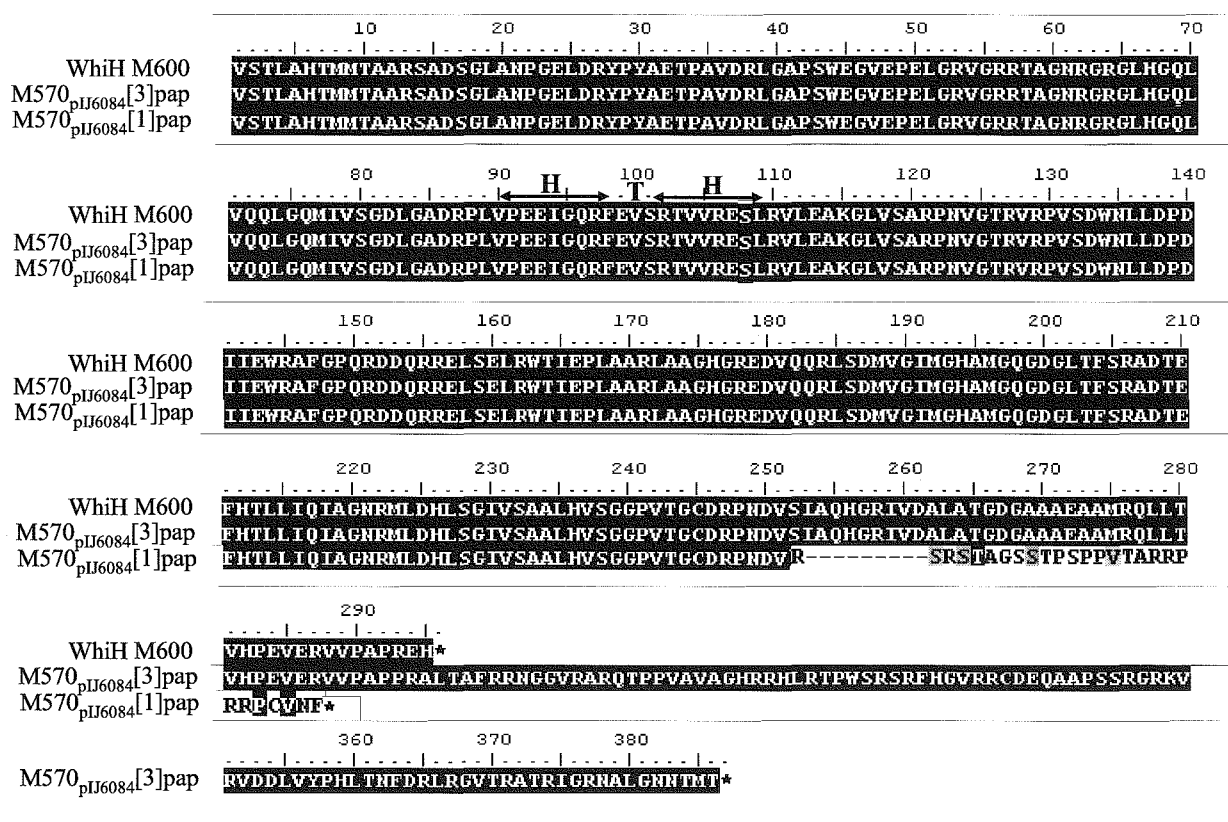


Figure 49 : Alignement de la séquence protéique de WhiH de M600 et des mutants Pig⁻pap M570_{pIJ6084}[1]pap et M570_{pIJ6084}[3]pap. L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit. Les acides aminés écrits en blanc sur fond noir sont ceux identiques entre la séquence du mutant considéré et celle de M600 alors que les acides aminés écrits en noir sont ceux qui diffèrent. Le symbole * indique un codon stop. Le motif Hélice(H)-Tour(T)-Hélice(H) caractéristique des régulateurs GntR est indiqué.

Enfin, le mutant M570_{pIJ6084}[2]pap présentait une délétion de 33 nucléotides dans le gène *whiG*, soit 11 acides aminés, en 3' de la région 1 du gène codant ce facteur sigma (Figure 50).

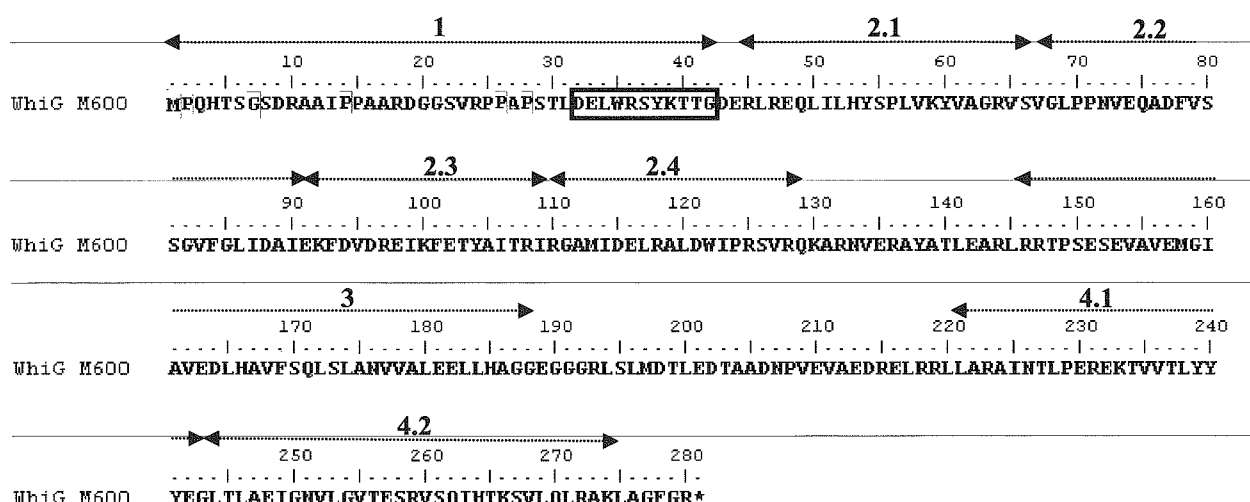


Figure 50 : Séquence protéique de WhiG de la souche M600 de *S. coelicolor*. Les 11 acides aminés délétés chez le mutant Pig^{pap} M570_{pIJ6084}[2]^{pap} sont encadrés. Le symbole * indique le codon stop. Les régions caractéristiques des facteurs σ appartenant à la famille des facteurs σ^{70} sont indiquées par des double flèches.

La région 1 des facteurs σ^{70} est importante pour la liaison à l'ADN et l'initiation de la transcription.

Ainsi, les papilles produites lors de l'induction de la synthèse de (p)ppGpp chez la souche M570 comportant le plasmide pIJ6084 présentent les mêmes caractéristiques que celles caractérisées chez *S. coelicolor* M600.

3.4 Séquençage du gène *relA* chez *S. ambofaciens*

La construction d'un mutant délété du gène *relA* chez *S. ambofaciens* a été envisagée, de manière à déterminer si un mutant *relA* de *S. ambofaciens* présentait le même phénotype que le mutant M570 de *S. coelicolor*, à savoir une abolition de la production de papilles. La technique de PCR-targeting (Gust *et al.*, 2003) a été considérée pour construire ce mutant. Dans un premier temps, le séquençage du gène *relA* de *S. ambofaciens* a été entrepris afin de déterminer le pourcentage d'identité avec son homologue de *S. coelicolor* et d'avoir accès à la séquence de ce gène chez *S. ambofaciens*. Trois couples d'oligonucléotides ont été dessinés d'après la séquence de *S. coelicolor* A3(2) dont le génome a entièrement été séquencé. Un premier couple permettait l'amplification d'une partie interne (420 pb) à la région codant l'activité (p)ppGpp synthétase. Les 2 autres couples permettaient d'amplifier 2 fragments

d'ADN, un comprenant la région 3' du gène *apt* (gène en amont de *relA*), la région promotrice de *relA* et la partie 5' de ce gène, l'autre comprenant la région 3' du gène *relA*, la région intergénique et la région 5' d'*ORF3* (gène en aval de *relA*) (Figure 51), afin de déterminer si l'environnement génétique était identique entre les 2 espèces.

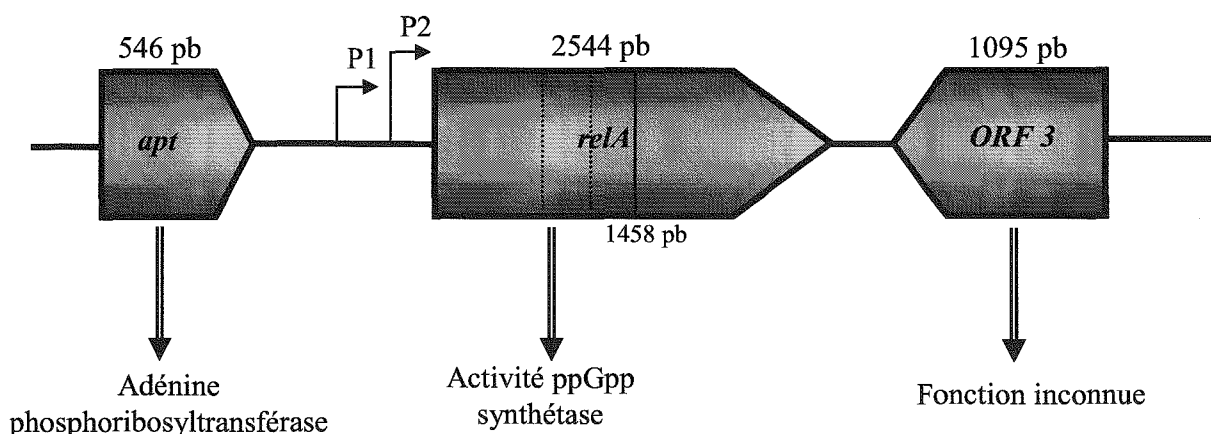


Figure 51 : Schéma représentant l'environnement du gène *relA* chez *S. coelicolor* M600. Les 2 promoteurs P1 et P2 en amont du gène *relA*, la taille des 3 ORF (*apt*, *relA* et *ORF3*), la fonction de chacune d'elles et leur orientation de transcription sont indiqués (d'après Chakraborty *et al.*, 1996). La partie N-terminale de *relA* codant l'activité (p)ppGpp synthétase est délimitée par un trait noir. La partie séquencée chez *S. ambofaciens* est délimitée par des traits en pointillés.

Le séquençage du fragment de PCR de 420 pb correspondant à la partie interne du gène *relA* chez la souche *S. ambofaciens* ATCC23877 a révélé 97 % d'identité avec le gène *relA* de *S. coelicolor* sur 359 nucléotides analysés (Figure 52) et 98 % d'identité en acides aminés.

```

>gi|1147591|emb|X87267.1|SCAPTRELA S.coelicolor apt & relA genes
Length = 3350

Score = 632 bits (319), Expect = e-179
Identities = 349/359 (97%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgccctggtcgcccagagcgcgcgccccaagcgcgcgacgagtacctcgccatcgctcacccgacgag 60
      |||||
Sbjct: 1699 cgccctggtcgcccagagcgcgcgccccaagcgcgcgacgagtacctcgccgctcgctcacccgacgag 1758

Query: 61 gtgcagcaggacctgcgcgcgggcccgatcaaggcgacccgtgaccggcgccgccccaagcac 120
      ||
Sbjct: 1759 gtccagcaggacctgcgcgcgggcccgatcaaggcgacccgtcacccggcgccgccccaagcac 1818

Query: 121 tactacagcgctctaccagaagatgatcgctccggcgccgctgacttcgcgaggagatctacgac 180
      |||||
Sbjct: 1819 tactacagcgctctaccagaagatgatcgctccggcgccgggacttcgcgaggagatctacgac 1878

Query: 181 ctggtggggcatccgcgctcctgggtggacacgggtccgcgcgactgctacgcggcgctcgggcacg 240
      |||||
Sbjct: 1879 ctggtggggcatccgcgctcctgggtggacacgggtccgcgcgactgctacgcggcgctcgggcacg 1938

Query: 241 gtccacgccccgctggaacccgggtccggggcggttcaaggactacatcgcgatgcccgaag 300
      |||||
Sbjct: 1939 gtccacgccccgctggaacccgggtccggggcggttcaaggactacatcgcgatgcccgaag 1998

Query: 301 ttcaacatgtaccagtcgctgcacacgacgggtcatcgggcccaacgggcaagccgggtcga 359
      |||||
Sbjct: 1999 ttcaacatgtaccagtcgctgcacacgacgggtcatcgggcccgccgggcaagccgggtcga 2057

```

Figure 52 : Résultat du BLASTN, réalisé sur le serveur du NCBI. La requête (Query) correspond à un fragment de PCR obtenu à partir d'oligonucléotides dessinés grâce à la séquence du gène *relA* de *S. coelicolor* disponible dans les banques de données en utilisant comme matrice l'ADN de la souche *S. ambofaciens* ATCC23877. Le BLASTN révèle 97 % d'identité avec un fragment interne au gène *relA* de *S. coelicolor*.

La partie interne du gène *relA* apparaît donc conservée entre *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. Pour les 2 autres couples d'oligonucléotides, aucun produit d'amplification n'a pu être obtenu à partir de l'ADN de *S. ambofaciens* alors qu'un produit d'amplification l'était en utilisant comme matrice l'ADN de *S. coelicolor*, servant de témoin positif de PCR. Même en baissant la température d'hybridation, aucun produit spécifique n'a été obtenu. L'impossibilité d'amplifier les régions en amont et en aval du gène *relA* suggère que l'environnement ou le mode de régulation (notamment au niveau de la région promotrice) du gène *relA* chez *S. ambofaciens* pourraient être différents de ce qui est observé pour son homologue chez *S. coelicolor*. Ceci laisse en suspens la question de la similitude des mécanismes de déclenchement de la réponse stringente entre les 2 espèces de *Streptomyces*. La construction du mutant *relA* de *S. ambofaciens* n'a pas été poursuivie.

4 Publications

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet de 2 articles dont un a été publié en mars 2006 dans Mutation Research et un est en cours de soumission dans ce même journal et de 2 communications orales (voir en annexes).



Genetic instability of *whiG* gene during the aerial mycelium development of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 under different conditions of nitrogen limitations

Magali Genay, Sibel Catakli, Alexandra Kleinclauss, Axelle Andrieux,
Bernard Decaris, Annie Dary*

Laboratoire de Génétique et Microbiologie (UMR INRA/UHP 1128), IFR 110, Faculté des Sciences de l'Université Henri Poincaré,
Inst. Nat. de la Recherche Agronom., Nancy 1, BP239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received 15 August 2005; received in revised form 16 September 2005; accepted 15 October 2005

Available online 4 January 2006

Abstract

In *Streptomyces ambofaciens*, white papillae that genetic instability events generate during aerial mycelium growth, give rise to Pig-pap mutants which are unable to sporulate and devoid of large genome rearrangement. Knowing that genetic and environmental factors can influence the number of papillae per colony, we investigated the effect of nutrient limited conditions of growth on the formation of white papillae. We observed that under nitrogen limitation and, most particularly, under amino acid limitation, the number of papillae per colony dramatically increased. Most of the Pig-pap mutants deriving from such papillae displayed a mutation in the *whiG* gene, which encodes the sigma factor σ^{whiG} which is absolutely required for the sporulation process. In most cases, the mutation led to a loss of function. We showed that the Pig-pap mutants deriving from papillae appearing under usual growth conditions also frequently displayed null mutation of *whiG* too. As the *whiG* mutation ratio among the Pig-pap mutants isolated with or without nitrogen limited conditions did not change, the results described in this paper suggest that the production of papillae could constitute a response of *S. ambofaciens* to an amino acid limitation.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Streptomyces*; Genetic instability; Differentiation; *whiG*; Nutrient limitation

1. Introduction

Streptomyces are Gram positive soil bacteria with a high GC content which undergo a complex cycle of morphological differentiation associated with the production of secondary metabolites such as numerous antibiotics [1]. On a solid medium, the germination of a spore gives rise to vegetative mycelium with a radial growth,

from which aerial mycelium develops. The last step of the *Streptomyces* morphological differentiation consists of spore individualisation at the aerial hyphae extremities [2]. The characterisation of *S. coelicolor* mutants impaired at different steps of the differentiation process has led to the identification of several genes implicated in this phenomenon which can be split into two groups. The first includes genes, such as the *bald* genes, which are required for aerial mycelium erection while the second, such as the *whi* genes, corresponds to genes involved in the spore maturation process [3]. According to the differentiation step where they are stopped, the *S. coelicolor*

* Corresponding author. Tel.: +3383684267; fax: +33 3 83 68 42 74.
E-mail address: Annie.Dary@scbiol.uhp-nancy.fr (A. Dary).

whi mutants exhibited a typical aerial hyphae morphology. Thus, the *whiG* mutants harbour a typical phenotype consisting of straight aerial hyphae without spores [4]. Indeed, *whiG* encodes the RNA polymerase sigma factor WhiG which is absolutely required for the shift from aerial growth to sporulation. In *Streptomyces ambifaciens*, *whi* mutants seem to be produced at high frequency during the aerial mycelium development of a colony. Indeed, this species as the other *Streptomyces* species exhibit a high degree of genetic instability which usually occurred at different development stages [5]. In the progeny of a *S. ambifaciens* wild type colony, which is grey, pigment-deficient colonies and pigmented colonies harbouring one or several sectors and/or white papillae are observed at high frequency (>1%). Sectors are thought to result from a mutational event occurring during vegetative mycelium development, while papillae could be generated by a mutation arising during the aerial mycelium development. The pigment-defective colonies could result from the germination of a mutant spore, produced by a mutational event occurred during sporulation. Mutants deriving either from pigment-defective colonies (Pig-col), sectors (Pig-sec) or papillae (Pig-pap) do not display the same features [6]. The Pig-col and Pig-sec mutants synthesise different amount of grey pigment and/or antibiotics and only a small fraction (<10%) is unable to sporulate [6]. At the molecular level, deletions of chromosomal fragment(s) of several hundreds of kilobases and/or amplification of adjacent sequence are often detected at the extremities of the chromosomal DNA which is linear in *Streptomyces* bacteria [7]. Conversely, the Pig-pap mutants share characteristics which distinguish them from the two other types of mutants: they display a *whi* phenotype since they produced aerial mycelium but no spores and do not possess any large genome rearrangements [6].

As recently reported, the characterization of three Pig-pap mutants, deriving from three independent mutational events revealed that the sporulation process was blocked at the initial step since each of them exhibited a WhiG-like phenotype. Although the introduction of one copy of *S. coelicolor whiG* restored the sporulation process in each mutant, their phenotype did not result from a mutation in their own *whiG*, since it was devoid of mutation, but rather from an absence of an active σ^{whiG} . Indeed, in these mutants, *whiH*, the expression of which depends on an active σ^{whiG} , was not transcribed suggesting that σ^{whiG} was absent or inactive. Besides, such a putative absence did not result from a modification of the transcription of *whiG* in these mutants. These results led us to propose that the regulation of

whiG might constitute a target of genetic instability during the aerial mycelium development in *S. ambifaciens* [8].

Genetic and environmental factors can influence the number of papillae per colony. In previous works, we have shown that the number of papillae appears to be genetically determined and constitutes a good indicator to isolate mutator strains [6]. Further, initial works suggested that the growth conditions might exert an influence over the number of papillae per colony. Most particularly, it was observed that the number of papillae was greatly increased when *S. ambifaciens* was grown on a minimal medium [9]. This prompted us to characterize further such a phenomenon and to determine whether the Pig-pap mutants isolated in these conditions displayed the same features than that previously reported. Thus, it was observed that under nitrogen limited conditions of growth, more specifically under an amino acid limitation, the colonies displayed high number of papillae which gave rise to Pig-pap mutants frequently mutated in the *whiG* gene. In most cases, the resulting mutant σ^{whiG} was truncated and devoid of at least the 4.2 region, which is required for the recognition of the -35 promoter sequence of the genes that this sigma factors regulates. The analyses of several Pig-pap mutants deriving from papillae obtained under usual conditions of growth revealed that they also frequently displayed a null mutation in *whiG*. Among the Pig-pap mutants arising from papillae generated under nitrogen limited or usual conditions of growth, the proportion of *whiG* mutants did not change, leading us to propose that white papillae which appeared on the surface of coloured colonies of *S. ambifaciens* could constitute a response to an amino acid limitation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

S. ambifaciens strains used in this work and listed in Table 1, derived from two WT sub-clones of *S. ambifaciens* ATCC23877, WT8 and WT12 whose genetic instability has been previously characterized [6,10]. The Pig-pap mutants used in this work derived from independent mutational events, since each of them derived from one white papilla present at the surface of different colonies, grown on different media and/or Petri dishes. To obtain such mutants, each papilla was carefully picked up using a sterile toothpick and sub-cultured 2 or 3 times each time choosing a white colony, until the progeny was homogeneous, i.e. consisting of white colonies.

Streptomyces strains were grown at 30°C either in Hickey-Tresner (HT) liquid or solid medium [11], in its

Table 1
S. ambifaciens strains used in this work

<i>Streptomyces ambifaciens</i> strains	Origin	Reference
WT8 WT12	<i>S. ambifaciens</i> ATCC 23877	[6]
WT8pap1	Papilla of WT8 grown on HTC1 medium	This work
WT8pap4	Papilla of WT8 grown on HTC4 medium	
WT12pap5	Papilla of WT12 grown on HTC5 medium	
WT12pap7	Papilla of WT12 grown on HTC7 medium	
WT8pap1(<i>whiG</i>)	WT8pap1 with pSET152(<i>whiG</i>)	
WT8pap4(<i>whiG</i>)	WT8pap4 with pSET152(<i>whiG</i>)	
WT12pap5(<i>whiG</i>)	WT12pap5 with pSET152(<i>whiG</i>)	
WT12pap7(<i>whiG</i>)	WT12pap7 with pSET152(<i>whiG</i>)	
WT12pap5GpA	Papilla of WT12pap5(<i>whiG</i>)	
WT12pap7GpB	Papilla of WT12pap7(<i>whiG</i>)	
5pap7	Papilla of WT8 grown on HTC7 medium	
7pap7	Papilla of WT8 grown on HTC7 medium	
9papHT	Papilla of WT8 grown on HTC medium	
14papHT	Papilla of WT8 grown on HTC medium	
16papHT	Papilla of WT8 grown on HTC medium	

derivatives (HTC1 to HTC8, see Table 2) or in YEME liquid medium [12]. The HTC7+aa medium was made by adding in HTC7 medium a solution containing the 18 amino acids which are present in Bacto tryptone. This solution contained the following amino acids: alanine (60 mg/l), arginine (60 mg/l), aspartic acid (120 mg/l), cysteine (10 mg/l), glutamic acid (340 mg/l), glycine (40 mg/l), histidine (40 mg/l), isoleucine (90 mg/l), tyrosine (30 mg/l), leucine

(150 mg/l), lysine (140 mg/l), methionine (55 mg/l), phenylalanine (75 mg/l), proline (150 mg/l), serine (90 mg/l), threonine (70 mg/l), tryptophan (15 mg/l), valine (100 mg/l). This solution was sterilised by filtration.

E. coli strain MRF'307 [13] containing the plasmid pSET152 or pSET152(*whiG*) [8] was grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) liquid or solid medium [14]. Conjugation between *E. coli* and *Streptomyces* was done on HT medium containing MgCl₂ (10 mM).

2.2. Plasmids, transformation and conjugation procedures

E. coli MRF'307 was transformed by the plasmid pSET152 or pSET52 (*whiG*) by electroporation under standard conditions previously described [15]. The transformants were selected on LB solid medium supplemented with tetracycline, kanamycin and apramycin, at a respective final concentration of 30 µg/ml. Then, *E. coli* strains were mated with *S. ambifaciens* Pig-pap mutants using the procedure previously described [13]. Exconjugants were selected by adding apramycin and ampicillin (50 µg/ml), replicated on HT solid medium and their phenotype was observed after 14 days of growth at 30°C.

2.3. Sporulation assay

To determine the capacity of a *Streptomyces* strain to sporulate, colony fragments were stained using the Gram reaction and observed by light microscopy [6].

2.4. DNA extraction, restriction fragments, Southern analyses and pulsed-field gel electrophoresis

S. ambifaciens total DNA was extracted as described elsewhere [16] 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. [14]. Southern blotting, prehybridisation and hybridisation were performed as previously described [17]. Labelling of probes and detection of specific hybrids were performed using the DIG-DNA labelling and detection kit, under the supplier conditions (Roche Molecular Biochemi-

Table 2
Composition of HT and HTC media used in this work

	HT	HTC1	HTC3	HTC4	HTC5	HTC7	HTC8
Yeast extract (g/l)	1	0.25	0.25	1	0.25	1	1
Beef extract (g/l)	1	0.25	0.25	0.25	1	1	1
White dextrin (g/l)	10	2.5	2.5	2.5	2.5	10	10
Bacto tryptone (g/l)	2	0.5	2	0.5	0.5	0	4
CoCl ₂ (mg/l)	20	5	5	5	5	20	20

The concentrations indicated in bold characters are identical with that of HT medium. Each medium was realised using MilliQ water and sterilised by autoclaving 20 min at 120°C.

Table 3
Nucleotide sequence of oligonucleotides used in this work

Primer	Sequence of the primer	Annealing temperature (°C)
G1	5'-CGAGTGATCACCCAGAGC-3'	55
G2	5'-TGATCTCCCGGTGACGT-3'	55
G3	5'-ACGCTCGACGAGCTGTGG-3'	55
G4	5'-GGCGGTGTCTCCAGGGT-3'	55
G5	5'-GTGGAGGACCTCCACCGG-3'	55
G6	5'-GCACGCTGCATCGACCGG-3'	55
C31.1	5'-GACGATGTAGGTCACGGTC-3'	50
C31.2	5'-TCGAGAACCCGCTGACGCT-3'	50
SSCP1	5'-CACGGCAGAACGGCACTA-3'	58
SSCP2	5'-GTCCGCCGGTCGTCTTGTA-3'	58
SSCP3	5'-TATTTACAGAGGGGCGAG-3'	58
SSCP4	5'-GAACACCCCGAGGAGAC-3'	58
SSCP5	5'-GGGTGATCGCGTACGTCT-3'	58

These sequences were deduced from the genome sequence of *S. coelicolor* available in the GeneBank database. The annealing temperatures used for the PCR reactions are indicated. The localisation of the different oligonucleotides, except for C31.1 and C31.2, are indicated in Figs. 3 and 5.

calls). For PFGE analyses, *S. ambofaciens* strains were grown for 36 h at 30 °C with agitation (250 rpm) in YEME liquid medium and total DNA was prepared as described previously [18]. Pulsed-field gel electrophoresis was realised in the CHEF system (Biorad) using 1% agarose gels which were run in 0.5× TBE buffer for 20 h with a pulse time of 40–160 s.

2.5. Sequencing of *whiG* gene, PCR and long range PCR conditions

Three couples of oligonucleotides (G1/G2, G3/G4 and G5/G6, see Table 3) were used to amplify and sequence the complete copy of the *whiG* gene. The amplification of the *S. coelicolor* transgenic copy of *whiG* in the strains WT12pap5GpA and WT12pap7GpB was carried out in two steps. The first consisted of amplifying the plasmid pSET152(*whiG*) by Long Range PCR, using the oligonucleotides C31.1 et C31.2 (Table 3), which match the chromosomal integration site of pSET152. The second step consisted of a classic PCR using the couples of oligonucleotides G1/G2, G3/G4 or G5/G6. The PCR and long range PCR methods were realised as previously described [8]. Each PCR product was sequencing using the DNA sequencing kit (Applied Biosystem) and the ABI Prism 310 system. Sequence comparisons and alignments were performed with the SeqApp program using ClustalW algorithm.

2.6. Single strand conformation polymorphism (SSCP)

The different PCR products were denatured for 4 min at 95 °C and separated on polyacrylamide gel 8% in TBE 0.6× at

20 W constant for 4 h. The single strands were revealed after coloration for 2 min in ethidium bromide (0.5 µg/ml).

3. Results

3.1. The number of white papillae per *S. ambofaciens* colony drastically increased under amino acid limitation

To test the effect of nutrient limited conditions of growth on the formation of white papillae, the wild type sub-clones WT8 and WT12 were grown on media which contained the same type but not the same concentration of each nutrient. Consequently, different derivatives of the HT medium which corresponds to the medium usually employed to grow *S. ambofaciens* and to observe its genetic instability [19], were made (Table 2). The distributions of the number of papillae per colony (npc) were established, after 14 days of growth at 30 °C, on a sample of 30 randomly selected colonies. The npc distributions established after growth on HT medium (Fig. 1A) were used as reference. In addition, we checked that the capacity of WT8 and WT12 spores to germinate on the different media was similar, as well as the diameter of colonies after 14 days of growth at 30 °C. Thus, the variations of the npc distributions which were observed did not seem to result from a deep alteration of colony growth.

On HTC1 medium, the WT8 and WT12 colonies exhibited a higher number of papillae than those grown on HT, since most of them harboured more than 50 papillae (Fig. 1B). Although we cannot exclude the hypothesis of a selection of numerous papillae under such growth conditions, these results suggested that under a nutrient limitation, the production of papillae was strongly stimulated. Indeed, the concentrations of the different nutrients were 4 times lower in HTC1 than in HT and hence nutrients became more rapidly limiting.

To determine whether the reduction of one particular nutrient concentration was at the origin of the npc increase, WT8 and WT12 were grown on HTC3, 4 and 5 media which present the same composition than HTC1, except for one nutrient (Table 2). For example, in HTC3 the Bacto tryptone concentration is identical to that of HT. After 14 days of growth, the npc distributions observed on HTC4 and HTC5 (Fig. 1D) were similar with those of HTC1 (Fig. 1B), while the number of papillae per colony grown on HTC3 (Fig. 1C) was clearly reduced since the npc distributions appeared to be similar to the ones for HT (Fig. 1A). This led to the hypothesis that a limitation in Bacto tryptone could account for the npc increase observed on HTC1.

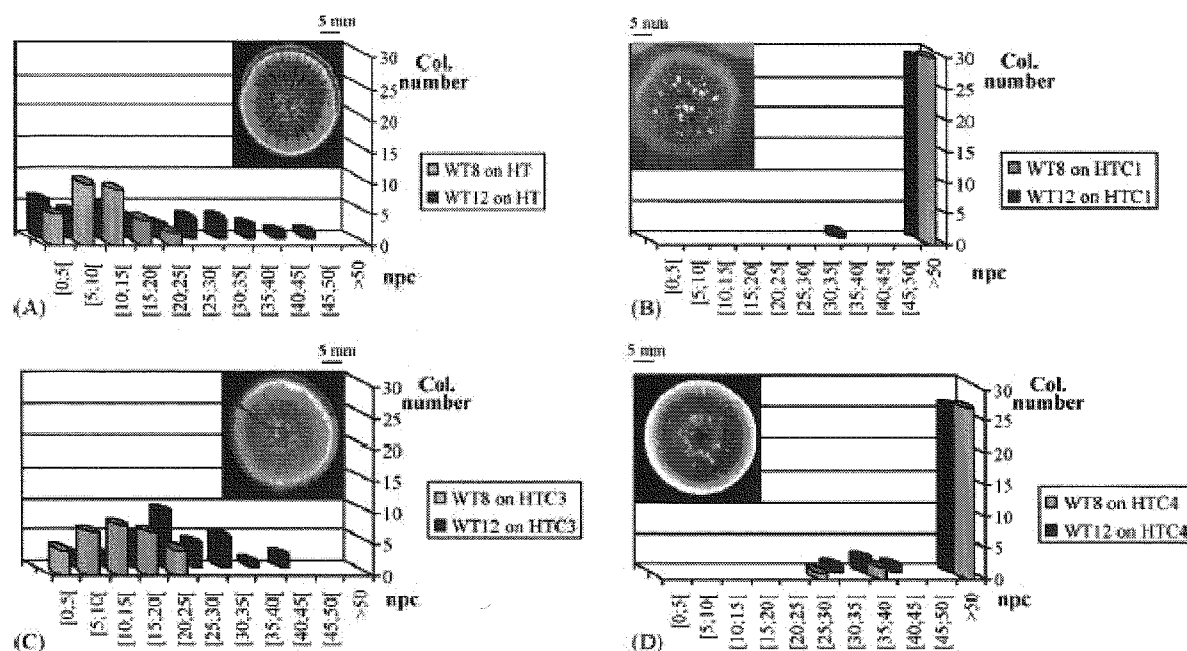


Fig. 1. Distributions of the number of papillae per colony (npc) of *S. ambifaciens* WT8 and WT12 grown 14 days at 30 °C on HT (A), HTC1 (B), HTC3 (C) and HTC4 (D) media. Distributions on HTC5 were similar with HTC4. For each medium, 30 colonies were randomly selected and their number of papillae determined. npc values were grouped together by classes of 5. The number of colonies (Col. number) observed for each class are shown on the Y-axis. For each distribution, the photograph shows a representative phenotype.

To confirm the effect of the Bacto tryptone limitation on the production of white papillae, WT8 and WT12 were grown on HTC7 and HTC8 media (Table 2). They have the same composition that HT medium except for Bacto tryptone concentration since the HTC7 medium did not contain any Bacto tryptone and HTC8 medium contained two times more Bacto tryptone than HT medium. Colonies grown in the absence of Bacto tryptone, i.e. on HTC7, exhibited a high number of papillae (Fig. 2A) while colonies grown in presence of a high concentration of Bacto tryptone (HTC8) exhibited little or not papillae (Fig. 2B). Thus, these results confirmed the implication of a Bacto tryptone limitation in the increase of papillae production.

As amino acids are the main constituent of Bacto tryptone, we tested whether a supplementation of the HTC7 medium by a solution of the amino acids present in Bacto tryptone (see Section 2), could induce a variation in npc after 14 days of growth of WT8 strain. In these conditions, the npc distribution was similar with that observed on the HT medium, since the majority of colonies exhibited less than 10 papillae (Fig. 2C).

To conclude, these results suggest that under an amino acid limitation many papillae are selected or generated during the aerial mycelium growth of the *S. ambifaciens* colonies.

3.2. *whiG* is a target for genetic instability events generating papillae under nutrient limitation conditions of growth

Four HTC Pig-pap mutants (WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 and WT12pap7), deriving from four papillae of *S. ambifaciens* colonies grown on the media HTC1, HTC4, HTC5 and HTC7, i.e. on which most colonies presented more than 50 papillae, were isolated. Each of them displayed a white mutant phenotype and no spore was detected on colonies grown for 7 days at 30 °C while at this growth time, the WT colonies are pigmented and sporulate. Although the progeny of each of these four Pig-pap mutants appeared to be homogeneous, we ensured that WT genome did not exist within the mutant mycelium by plating about 50,000 colonies of each strain on HT medium. After 7 days of growth at 30 °C, no WT, i.e. pigmented colony, was observed. Thus, the reversion rate of each mutant was below 5×10^{-5} . Finally, the *Asel* restriction profile of these four HTC Pig-pap mutants was found to be identical with that of WT8 (data not shown), leading to the conclusion that they did not contain any large genome rearrangement. Altogether, such observations suggested that these four HTC Pig-pap mutants harboured the same characteristics than those already described in Pig-pap mutants [8].

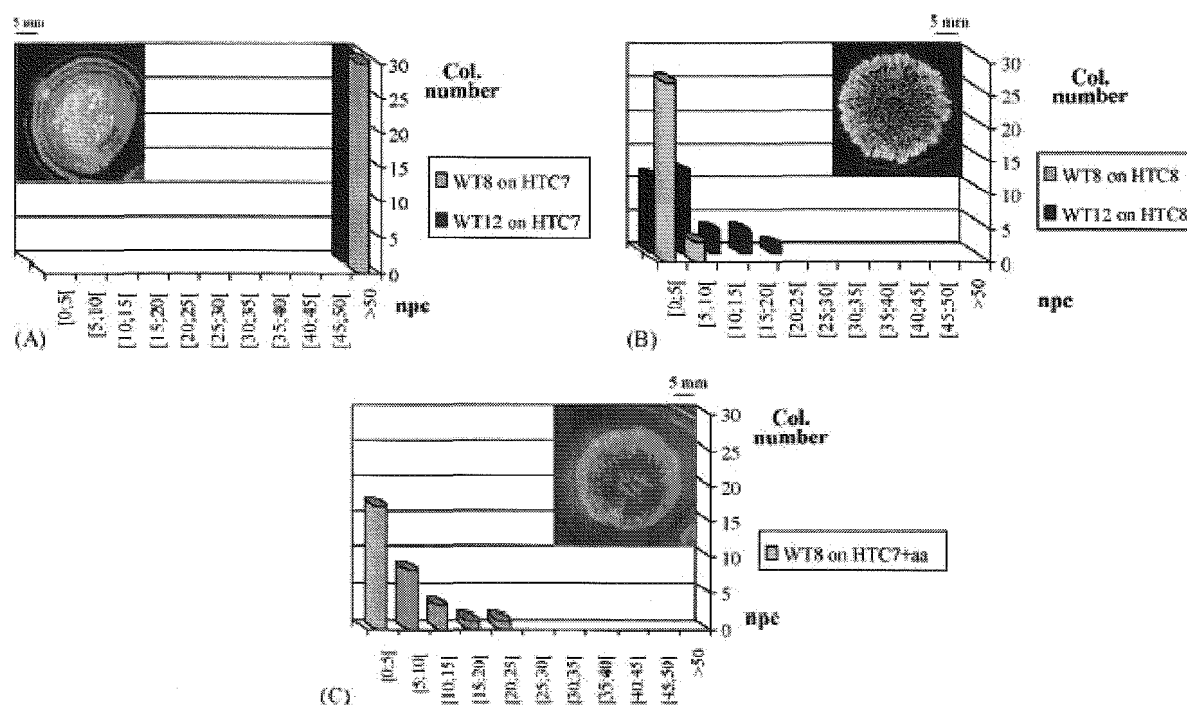


Fig. 2. Distributions of the number of papillae per colony (npc) of *Streptomyces ambifaciens* WT8 and WT12 grown 14 days at 30°C on HTC7 (A) and HTC8 (B) media and WT8 npc distribution established on HTC7 + aa (C). For each medium, 30 colonies were randomly selected and their number of papillae determined. Npc values were grouped together by classes of 5. The number of colonies (Col. number) observed for each class are shown on Y-axis. For each distribution, a photograph shows a representative phenotype.

The plasmid pSET152(*whiG*) was then introduced by conjugation using *E. coli* MRF⁺307 as donor in the four mutants to determine whether the introduction of one copy of *S. coelicolor whiG* led to the suppression of their mutant phenotype. The exconjugants obtained with pSET152, used as control, remained white while the 12 exconjugants obtained for the four HTC Pig-pap mutants exhibited a WT phenotype consisting of grey sporulated colonies also exhibiting white papillae, in spite of the presence of an additional copy of *whiG*.

The determination of the sequence of *whiG* of the four HTC Pig-pap mutants was achieved and allowed the detection of a mutation in each case (Fig. 3). In three cases, the mutation led to a loss of function since the σ^{whiG} expected from the mutant sequence lacked of at least the 4.2 region, which is required for the -35 promoter sequence recognition (Fig. 4). Indeed, σ^{whiG} belongs to the σ^{70} family which is characterised by four conserved regions, of which, 2.4 and 4.2 are highly conserved and involved in -10 and -35 promoter sequence recognition of the genes that these sigma factors regulate [20]. Thus, a -1 frameshift mutation consisting of a deletion of a guanine in a stretch of five guanines (nt 789–793) was detected in WT8pap1 (Fig. 3), while a $+1$ frameshift mutation corresponding to the addition of a cytosine in a stretch of six cytosines (nt 257–262) was

observed in WT12pap5 (Fig. 3). Finally, a substitution (replacement of a guanine by a thymine) which generated a stop codon was detected in WT8pap4 at position 705 (Fig. 3) and led to a truncated σ^{whiG} (Fig. 4). In the case of WT12pap7, a substitution (replacement of an adenine by a cytosine) was detected in the putative RBS sequence at position 215 (Fig. 3). Such a mutation could affect the translation efficiency, leading to the mutant phenotype observed in this strain.

Eight Pig-pap mutants deriving from 8 papillae appearing at the surface of 8 different exconjugants of WT8pap1, WT8pap4, WT12pap5 and WT12pap7 were isolated. First, 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 plasmid on *Bam*HI-digested genomic DNA. Six mutants lost this plasmid, explaining the return to the white phenotype of the papillae from which they derived. The two others (WT12pap5GpA and WT12pap7GpB) presented the plasmid, integrated into the *attB* site of ϕ C31 (data not shown). It was amplified by Long Range PCR using the primers C31.1/C31.2 (Table 3) and the transgenic copy of *whiG* was then amplified using three pairs of primers (G1/G2, G3/G4 and G5/G6) and sequenced. These experiments were done several times to ensure that the mutation which could be detected did not result

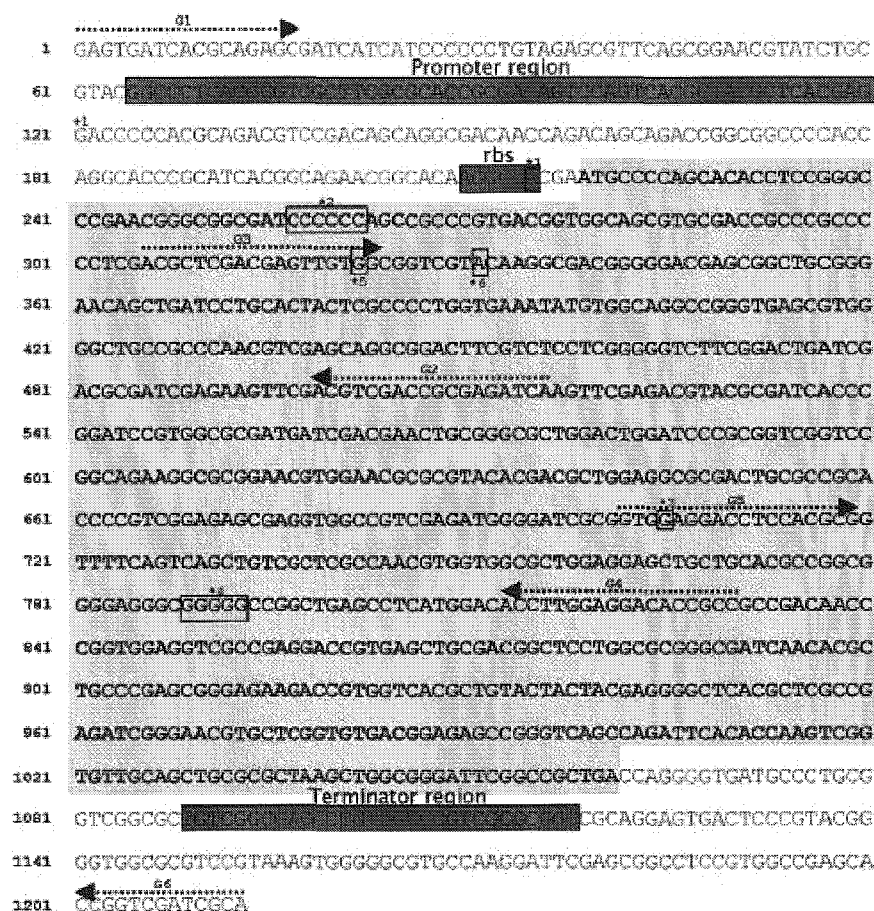


Fig. 3. *S. ambifaciens whiG* gene sequence, localisation of oligonucleotides used to amplify the different portions of this gene (marked by arrows) and positions of mutation in Pig-pap strains. Grey box indicates putative ORF of *whiG* gene and dark grey boxes indicate the promoter, RBS and terminator regions, respectively. The transcription start point (+1) is also indicated. Nucleotide(s) framed and noted *1, *2, *3, *4, *5 and *6 indicate the position of mutation detected in the four HTC Pig-pap mutants WT12pap7, WT12pap5, WT8pap4, WT8pap1 and the two HT Pig-pap mutants 16papHT and 9papHT, respectively. *2 corresponds to the *whiG* region which is frequently mutated, as in 5pap7, 7pap7 and 14papHT and in the transgenic copy of *whiG* of WT12pap5GpA and WT12pap7GpB.

from polymerase errors occurring during the two PCR steps. For the two mutants, a frameshift mutation corresponding to the addition of one cytosine in a repeat sequence of six cytosines (at position 257–262, Fig. 3) was detected. This frameshift mutation, confirmed three times for each strain, led to the expression of an inactive WhiG protein as in the case of WT12pap5 (Fig. 4). Although, the mutation present in the WT12pap5GpA *whiG* transgene is identical with that present in the *whiG* gene of its ancestor (WT12pap5), the sequence surrounding the mutation possesses 100% identity with that of *whiG* of *S. coelicolor* (data not shown), diminishing the probability that the mutation detected in the transgene derived from a genic conversion event.

To conclude, these results showed that the WhiG-like phenotype of the four HTC Pig-pap mutants isolated under nutrient limited growth probably resulted from a mutation in *whiG* which appeared to be a target of genetic

instability events occurring during the aerial mycelium development. Further, when their mutant phenotype was complemented by the introduction of one copy of *whiG*, this transgenic copy could also constitute a target for new genetic instability events generating new papillae.

3.3. Detection of *whiG* mutation by analyses of single strand conformation polymorphism in Pig-pap mutants deriving from HTC7 and HT papillae

As mentioned in the introduction, the three Pig-pap mutants characterized in a previous work [8] did not harbour any mutation in their own *whiG* though their phenotype was suppressed by the introduction of one copy of *S. coelicolor whiG*. Consequently, the fact that the four Pig-pap mutants described above were mutated in *whiG* raised the possibility that the molecular targets of

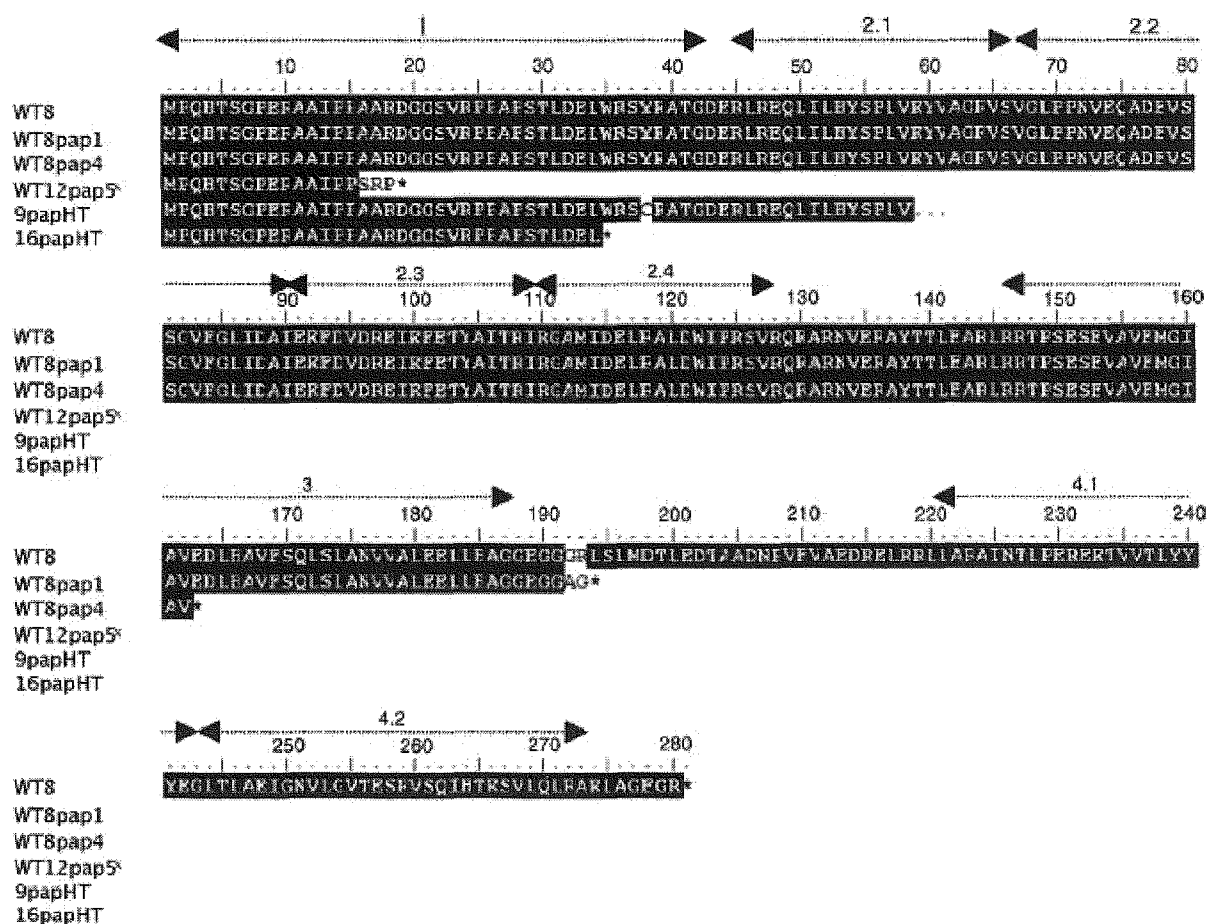


Fig. 4. End-to-end alignment of *WhiG* of Pig-pap mutants and *S. ambifaciens* WT8 strain. The alignment was made using the BioEdit software. Black boxes indicate similar residues between the sequences of the Pig-pap mutant and WT8 and white boxes residues which differ. The star (*) indicates a stop codon. The different regions of σ^{WhiG} are indicated by arrows. The letter x (x) means that the strains 5pap7, 7pap7, 14papHT and the *S. coelicolor whiG* transgene of WT12pap5GpA and WT12pap7GpB present the same mutation as the strain WT12pap5.

the genetic instability events varied either with or without nutrient limited growth conditions. To test such a hypothesis, we decided to check for *whiG* mutations in a large number of Pig-pap mutants deriving either from "HTC7" or from "HT papillae", by analyses of single-strand conformation polymorphism [21]. Thus, 16 HT Pig-pap mutants and 10 HTC7 Pig-pap mutants deriving from independent mutational events (see Section 2) were isolated. Mutation in *whiG* was checked by analysing the single strand conformation polymorphism (SSCP) of a region of *whiG* which appeared to be mutated at a high frequency (Fig. 5A). Indeed, a +1 frameshift mutation at position 257 (addition of one cytosine in a stretch of six cytosines) has been observed in five mutants resulting from five independent mutational events: WT12pap5, WT12pap5GpA and WT12pap7GpB strains (see above) and two other Pig-pap mutants deriving from papillae of (*whiG*) exconjugants [8].

To optimise the method, this portion of *whiG* was amplified from genomic DNA of strain WT8 and of two positive controls (WT12pap5GpA and WT12pap7GpB), using either the couple of primers SSCP1/SSCP2, SSCP1/SSCP3, SSCP1/SSCP4 or SSCP1/SSCP5 (Fig. 5A). The single-strand conformation polymorphism of the five PCR products of 155, 205, 278 and 348 bp, generated for each strain was analysed through electrophoreses (see Section 2). The conformation change resulting from the mutation present in the transgenic copy of *whiG* of the strains WT12pap5GpA and WT12pap7GpB was only detected with the PCR product of 205 bp (Fig. 5B). Indeed, in these two mutants one of the two single-strand DNA of the 205 bp PCR migrated more slowly than in the case of WT8. Consequently, total DNA of the 10 HTC7 Pig-pap and the 16 HT Pig-pap mutants was extracted and PCR reactions using SSCP1/SSCP3 were

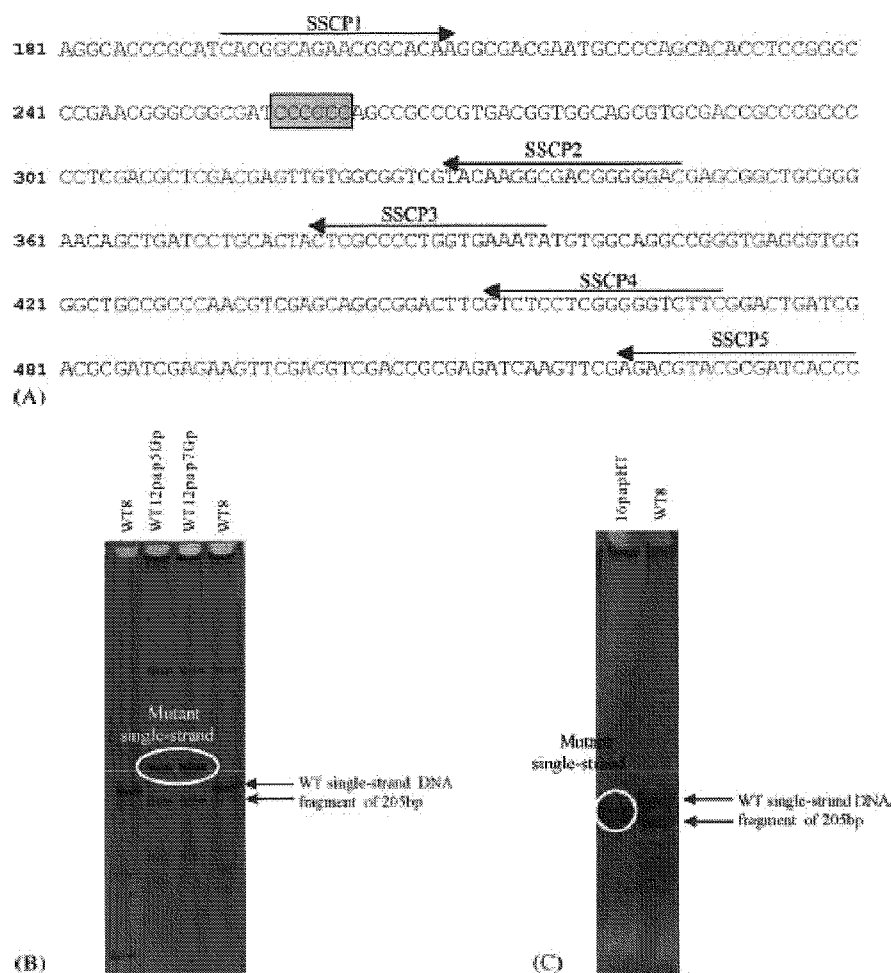


Fig. 5. A. Region of the *S. ambifaciens whiG* gene which contains a stretch of six cytosines frequently subject to mutation and localisation of oligonucleotides used for SSCP experiments. SSCP1/SSCP2, SSCP1/SSCP3, SSCP1/SSCP4 and SSCP1/SSCP5 pairs are used to amplify four products, respectively of 155, 205, 278 and 348 bp surrounding the frameshift mutation located in dark grey box. B. Mobility shift of single-strand PCR products of 205 bp resulting from the presence of a mutation in the strains WT12pap5GpA and WT12pap7GpB, compared with WT8. C. Mobility shift of single-strand PCR products of 205 bp resulting from the presence of a mutation in the strain 16papHT, compared with WT8.

performed. A single-strand conformational change of PCR product of 205 bp was detected in 4/10 HTC7 Pig-pap mutants and 5/16 HT Pig-pap mutants. In 8/9 cases, the electrophoretic patterns were similar to those of the strains WT12pap5GpA and WT12pap7GpB while the last mutant had a different one (Fig. 5C). Hence, mutation in this part of *whiG* was confirmed by sequencing the 205 bp PCR product of five of these nine Pig-pap mutants. Among them, four seemed to present the same conformation change that strains WT12pap5GpA and WT12pap7GpB, while the fifth mutant corresponded to the mutant that had a different conformation. In each case, a mutation was detected and consisted of either a +1 frameshift mutation (3/5 cases) or a substitution (2/5 cases). In 4/5 cases this led to the production of an inactive σ^{whiG} factor, since the protein synthesised was truncated and lacked of at least the 4.2

region (Fig. 4). The +1 frameshift mutation observed in the three mutants 5pap7, 7pap7 and 14papHT consisted of the addition of one cytosine in the stretch of six cytosines (nt 257–262, Fig. 3). In the mutant 9papHT, a substitution at position 331 (replacement of an adenine by a guanine, Fig. 3) led to an amino acid change since a tyrosine was replaced by a cysteine (Fig. 4), while the substitution present in the mutant 16papHT (replacement of a guanine by an adenine, Fig. 3) at position 322 generated a stop codon and hence an inactive σ^{whiG} factor since it was truncated (Fig. 4).

Thus, all of these results showed that the *whiG* gene constitutes a target for genetic instability events occurring during the aerial mycelium development since it appeared to be mutated in the Pig-pap mutants deriving either from HTC7 or HT papillae. We showed that at least 8/14 Pig-pap mutants deriving from HTC7 papillae and

at least 5/16 for Pig-pap mutants deriving from HT papillae harbored a mutation in their own *whiG*. As these two frequencies were not significantly different, it appeared that under nutrient limitation the number of white papillae per colony increased, but the *whiG* mutation ratio in Pig-pap mutants did not.

4. Conclusion

In this paper, we showed that genetic instability occurring during the aerial mycelium development can affect the *whiG* gene and that the quantity of amino acids present in the medium exerts an influence on the formation of white papillae in *S. antibiotici*. Therefore, we observed that under an amino acid limitation many papillae were present on the colonies and gave rise to Pig-pap mutants which appeared to be unable to sporulate, devoid of large genome rearrangement and frequently mutated in *whiG* (at least 8/14). In most cases (5/6), such a mutation led to a loss of function. These features were not specifically displayed by the Pig-pap mutants deriving from papillae appearing under nutrient limited conditions of growth since the analyses of 16 Pig-pap mutants, arising from papillae of colonies grown under usual conditions, also possessed mutation in *whiG* (at least 5/16) which led in most cases to a loss of function. In a previous work, the characterization of three Pig-pap mutants exhibiting a *WhiG*-like phenotype revealed that in these mutants, the *whiG* gene was not mutated but rather the σ^{WhiG} was inactive [8]. In this work, we highlighted the fact that it could exist two types of Pig-pap mutants, mutated in *whiG* or perhaps in its regulation, and that these two types of mutants can be produced on HT and perhaps on HTC media. In these two cases, the σ^{WhiG} is inactive and the phenotype observed is white.

Besides, our results suggested that the production of papillae, thus Pig-pap mutants, could constitute a response of *Streptomyces* to a limitation in amino acids. Indeed, two alternative hypotheses could account for the increase of papillae under amino acid limitation. The first implies that the papillae might be selected since advantageous within the colony under nutrient limited growth, while the second is that the production of papillae is stimulated under nutrient limited growth. In this last hypothesis, the increase of number of papillae per colony directly results from an increase of the mutation rate under certain conditions.

In nature, microbial populations are constantly confronted by variable environments such as a generalized scarcity of nutrients. In *E. coli*, adaptation to a scarcity of nutrients can favour mutants which have lost the RpoS function, though RpoS plays an important role for sur-

vival and adaptation under starvation conditions. Indeed, some *rpoS* mutants can possess a growth advantage in stationary phase and thus outgrow wild type cells during prolonged incubation [22–24]. These mutants may have an enhanced ability to scavenge amino acids and/or utilize poor carbon sources, indicating that mutations in *rpoS* may, in some cases, confer a selective advantage to the cell [24]. It has been proposed that expression of a large number of genes under RpoS control might constitute a significant metabolic burden to the cell and that the loss of the RpoS function by mutation may constitute a molecular switch that enables cells to thrive [25,26]. In *Streptomyces*, the situation might be similar. Indeed, *WhiG* potentially controls numerous genes whose those involved in the sporulation process. In certain conditions, such as under nutrient limitation, the mutations resulting in the loss of an active σ^{WhiG} could be advantageous, permitting the arrest of the sporulation process and perhaps a switch toward an alternative metabolism which can be favourable to the mutant portion of the colony or to the entire colony.

Finally, the proportion of Pig-pap mutant having a frameshift mutation among the *whiG* Pig-pap mutants appeared to be higher (7/11 cases) than that of mutants having a substitution in *whiG*. Such a situation appears to be similar to that observed in *E. coli*. Indeed, among the so-called stationary phase mutations, the frameshift mutations seem to be the most frequent and seem to involve particular functions such as *mutL* or *dinB* [27]. The production of papillae and, hence, of Pig-pap mutants in *S. antibiotici* might result from the same type of mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by “Le Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”. Many thanks to Virginie Acheré for her precious help in SSCP experiments.

References

- [1] K.F. Chater, D.A. Hopwood, Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, in: D.A. Hopwood, K.F. Chater (Eds.), Genetic of Bacterial Diversity, Academic Press, London, 1989, pp. 129–150.
- [2] K.F. Chater, Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony, Microbiology 144 (1998) 1465–1478.
- [3] K.F. Chater, D.A. Hopwood, *Streptomyces* genetics, in: M. Goodfellow, M. Mordarski, S.T. Williams (Eds.), The Biology of the Actinomycetes, Academic Press, London, 1984, pp. 229–286.
- [4] K.F. Chater, Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? Curr. Microbiol. 4 (2001) 667–673.

- [5] A. Dary, P. Martin, T. Wenner, P. Leblond, B. Decaris, Evolution of the linear chromosomal DNA in *Streptomyces*: is genomic variability developmentally modulated? *Res. Microbiol.* 150 (1999) 439–445.
- [6] 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.
- [7] Y.S. Lin, H.M. Kieser, D.A. Hopwood, C.W. Chen, The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear, *Mol. Microbiol.* 10 (1993) 923–933.
- [8] S. Catakli, A. Andrieux, B. Decaris, A. Dary, The sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of mutational phenomenon occurring during the aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877, *Res. Microbiol.* 156 (2005) 328–340.
- [9] J.N. Volff, Stimulation de l'instabilité génétique et des réarrangements génomiques chez *Streptomyces ambofaciens*, Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy 1, Nancy, 1994.
- [10] P. Martin, A. Dary, A. André, G. Fischer, P. Leblond, B. Decaris, Intracolonial 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.
- [11] 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*, *Antibiot. Ann.* (1956–1957) 947–953.
- [12] 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.
- [13] 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 repeat in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877, *Arch. Microbiol.* 179 (2003) 387–393.
- [14] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] P. Leblond, G. Fischer, F.X. Francou, F. Berger, M. Guérineau, 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.
- [19] 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.
- [20] M. Lonetto, M. Gribskov, C.A. Gross, The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 3843–3849.
- [21] M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86 (1989) 2766–2770.
- [22] S.E. Finkel, R. Kolter, Evolution of microbial diversity during prolonged starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 4023–4027.
- [23] M.M. Zambrano, D.A. Siegle, M. Almiron, A. Tormo, R. Kolter, Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures, *Science* 259 (1993) 1757–1760.
- [24] M.M. Zambrano, R. Kolter, GASPing for life in stationary phase, *Cell* 86 (1996) 181–184.
- [25] T. Ferenci, What is driving the acquisition of mutS and rpoS polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends Microbiol.* 11 (2003) 457–461.
- [26] G. Chen, C.L. Patten, H.E. Schellhorn, Positive selection for loss of RpoS function in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.* 554 (2004) 193–203.
- [27] M. Kivisaar, Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress, *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 814–827.

**Implication of stringent response in the increase of mutability of
the *whiG* and *whiH* genes
during *Streptomyces coelicolor* development**

Genay Magali, Decaris Bernard and Dary Annie*

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.

(*) corresponding author. Tel.: +3383684267 ; email : Annie.Dary@scbiol.uhp-nancy.fr

Keywords : *Streptomyces*, stringent response, genetic instability, differentiation, *whi* genes.

Abstract

In *Streptomyces ambofaciens*, genetic instability occurring during aerial mycelium development gives rise to white papillae at the surface of colonies. It has been established that such instability is stimulated under amino acid limitation. Pig-pap mutants deriving from such papillae are white, unable to sporulate and devoid of the large genome rearrangement usually observed in *Streptomyces* unstable mutants. Conversely, the Pig-pap mutants frequently harboured discrete mutations affecting the gene *whiG*.

In this work, we tested the implication of the stringent response, which is induced during an amino acid limitation, in the production of white mutant papillae. First, we established that *S. coelicolor* generated papillae and that such a production of mutants was increased under an amino acid limitation. Secondly, we showed that the Pig-pap mutants generated under amino acid limitation or not, frequently exhibited a mutation in *whiH* gene, and occasionally in *whiG* gene. Finally, we observed that a *relA* mutant of *S. coelicolor* was unable to produce white papillae, even when growing with amino acid limitation. The restoration of the (p)ppGpp synthase activity allowed papillae production. Molecular analysis of Pig-pap mutants isolated from white papillae of the complemented *relA* mutant showed that they share the same characteristics as Pig-pap mutants spontaneously appearing on wild-type colonies. Altogether, these results demonstrate that whatever the underlying mechanism, the stringent response is involved in the production of white papillae in *S. coelicolor*.

1. Introduction

The evolutionary process implies genetic polymorphism and stress. The first, by generating alternative phenotypes within a population, allows it to survive by selection of the fittest. The second is induced by sudden environmental changes which apply a strong selective pressure on the population. Many sorts of environmental stress might be encountered by population and among them, nutritional starvation is often applied to microorganisms. It has been shown that it results in genome-wide hypermutation, i.e., high mutation rates in various gene [1]. Metabolism of starvation is called stringent response whose first signal is the synthesis of the alahormone (p)ppGpp.

Escherichia coli possesses two enzymes, RelA and SpoT, involved in (p)ppGpp synthesis. During an amino acid limitation, uncharged tRNAs bind to the ribosomal A site and activate the ribosome-bound RelA, while carbon or phosphate limitations activate SpoT-dependent (p)ppGpp synthesis in a ribosome-independent manner [2-4]. SpoT is a bifunctional enzyme able to synthesise and hydrolyse (p)ppGpp [5,6]. In most Gram positive bacteria, only one *relA/spoT* homologue seems to be found, encoding both synthesising and hydrolysing functions [7-10]. However, a second member of the *relA/spoT* was recently identified in certain Gram positive bacteria. For example, the *rshA* gene of *S. coelicolor* causes the synthesis of (p)ppGpp during a phosphorus limitation [11].

The (p)ppGpp initiates a drastically change in cellular metabolism : it interferes with replication, transcription, recombination, DNA repair, induces morphological and physiological changes, contributes to virulence or secondary metabolism [3,12,13]. Indeed, the (p)ppGpp can positively or negatively regulate the transcription of many genes [14-16] by binding to the β and β' subunits of RNA polymerase. Thus, genes required for cellular division, cellular envelope formation, synthesis of rRNA and tRNA are repressed, whereas genes involved in amino acids biosynthesis and transport are derepressed. In addition, the

(p)ppGpp has a positive regulatory effect on *rpoS* gene, the general factor of stress response in *E. coli*, and activation of *rpoS* regulon constitutes a signal of imminent disturbance of growth and entry in stationary phase [17,18]. The (p)ppGpp also influences competitiveness of alternative sigma factors such as σ^{32} and σ^S since their ability to compete with σ^{70} is decreased in cells lacking ppGpp [19]. Finally, the induction of the stringent response can increase the mutation rate of genes which are positively regulated by the (p)ppGpp. Indeed, it has been shown that leucine starvation in a *E. coli leuB* strain triggers metabolic activities that specifically derepressed the leucine operon, increasing not only its rates of transcription but of mutation too. A quantitative correlation has even been established between the transcription rate and the *leuB* gene reversion. This might result from the great sensitivity of single strand DNA to hydrolysis. Therefore, the transcription process during which the coding strand is transitorily in a single strand form is source of mutations [1].

In *Streptomyces coelicolor*, a Gram positive soil bacterium with a high GC content and a complex morphological and physiological development cycle, the *relA* gene, encodes a 847 amino acids protein with a high degree of similarity to all known RelA/SpoT homologues (42.6% and 38.5% identity to the SpoT and RelA *E. coli* homologues). It possesses the (p)ppGpp synthetase and hydrolase activities [9,20]. The stringent response influences the physiologic differentiation of the *Streptomyces* since on certain culture media, a *relA* mutant being unable to induce the stringent response, fails to produce antibiotics [21-23].

In a previous work, we have shown that under an amino acid limitation, *S. ambofaciens* which is phylogenetically close to *S. coelicolor*, producing high number of white mutant papillae, resulting from genetic instability events probably during the aerial mycelium development [24]. Indeed, *S. ambofaciens* like the other *Streptomyces* bacteria presents a complex morphological development. On a solid medium, the germination of spores leads to radial growth of the primary mycelium from which develops the aerial

mycelium whose extremities become spores. The Pig-pap mutants deriving from such papillae are different from the mutants usually produced by the genetic instability observed in *Streptomyces*. While genetic instability usually generates mutants displaying large genome rearrangement located at the chromosomal DNA extremities, the Pig-pap mutants are devoid of such rearrangements [25] and frequently display discrete mutations. In most cases, these are frameshift mutations which inactivate the *whiG* gene, encoding the RNA polymerase sigma factor WhiG absolutely required for the shift from aerial growth to sporulation [24]. Thus, the Pig-pap mutants constitute a new aspect of genetic instability.

Increase of Pig-pap mutants under an amino-acid limitation led us to question on the potential role of the stringent response in the production of mutant papillae during aerial development. In a first time, we determined the capacity of a *S. coelicolor* wild type strain (WT) to produce white mutant papillae and established the molecular nature of the Pig-pap mutants deriving from such papillae. We showed that the *S. coelicolor* WT strain was able to produce papillae which generated Pig-pap mutants which did not display any large genome rearrangement but frequently discrete mutations in the *whiH* gene, encoding a GntR regulator acting in sporulation process, and sometimes in the *whiG* gene. In a second time, we compared the capacity of a *relA*⁻ mutant to produce papillae when grown on complete or amino acid limited medium with that of the WT strain grown in the same conditions. We therefore observed that the colonies of WT strain grown in amino acid limitation conditions produced a greater number [24] than that grown on a complete medium. Conversely, whether it was grown either on complete or amino acid limited medium, the *relA*⁻ mutant produced few or no papillae. The restoration of the capacity to synthesize (p)ppGpp led to the restoration of ability of producing papillae giving rise to mutants displaying the same mutation type than those deriving from papillae of the WT. Thus, all of these results led us to conclude that stringent response is involved in mutant papillae production in *S. coelicolor*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Streptomyces coelicolor strains used in this work are listed in table 1. The Pig-pap mutants characterised in this work derived from independent mutational events, since each of them derived from one white papilla present at the surface of different colonies, grown on different media and/or Petri dishes. To obtain such mutants, each papilla was carefully picked up using a sterile toothpick and sub-cultured 2 or 3 times each time choosing a white colony, until the progeny was homogeneous, i.e. consisting of white colonies.

S. coelicolor strains were grown at 30°C either in Hickey-Tresner (HT) liquid or solid medium [26], in HTC7 and HTC7+aa [24] or in YEME liquid medium [27]. The composition of the HTC7 medium is identical with that of the HT medium, except for the bacto tryptone which is absent in the HTC7 medium. The HTC7+aa corresponded to the HTC7 medium supplemented with amino acids [24].

The *tipA* promoter induction was obtained by adding near a colony grown 3 days, a disk soaked with 12 µl of a 1 µg/µl thiostrepton solution.

E. coli methylation-deficient strain ET12567(pUZ8002) [28] or its derivatives were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) liquid or solid medium [29]. Conjugation between *E. coli* and *S. coelicolor* was done on HT medium containing MgCl₂ (10 mM).

2.2. Plasmids, transformation and conjugation procedures

Transformation of *E. coli* ET12567(pUZ8002) by the plasmid pSET152 or pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*), pSET152(*whiJ*) [30], pIJ6084 or pIJ8600 [11] was performed by electroporation under standard conditions previously described [31]. The transformants were selected on LB solid medium supplemented with chloramphenicol (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and apramycin

(30 µg/ml). Then, *E. coli* strains ET12567(pSET152), ET12567(pSET152(*whiA*)), ET12567(pSET152(*whiB*)), ET12567(pSET152(*whiG*)), ET12567(pSET152(*whiH*)) and ET12567(pSET152(*whiJ*)) were mated with *S. coelicolor* Pig-pap mutants while *E. coli* strains ET12567(pIJ6084) and ET12567(pIJ8600) were mated with *S. coelicolor* M570 using the procedure previously described [32].

Exconjugants were selected by adding apramycin (30 µg/ml) and nalidixic acid (50 µg/ml), replicated on HT solid medium and their phenotype was observed after 14 days of growth at 30°C.

2.3. Sporulation assay

To determine the capacity of a *S. coelicolor* strain to sporulate, colony fragments were stained using the Gram reaction and observed by light microscopy [33].

2.4. DNA extraction, restriction fragments separation, Southern analyses and Pulsed-field gel electrophoresis

S. coelicolor total DNA was extracted as described elsewhere [34] 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.*, 1989. Southern blotting, prehybridisation and hybridisation were performed as previously described [35]. 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).

For Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analyses, *S. coelicolor* strains were grown for 36 hours at 30°C with agitation (250 rpm) in YEME liquid medium. Genomic DNA was prepared and digested with *AseI*, as described previously [36]. PFGE was realised using the CHEF system (Biorad) through 1% agarose gels which were run in 0,5x TBE buffer for 20 hours with a pulse time of 40-160s at 6V per cm.

2.5. Sequencing of *whiG* and *whiH* genes and PCR conditions

Two series of three primers pairs (G1/G2, G3/G4, G5/G6 and H1/H2, H3/H4, H5/H6, see table 2) were used to amplify and sequence the complete copy of *whiG* or *whiH* gene, respectively. These primer sequences were deduced from the *S. coelicolor* genome sequence which is available in the GeneBank database. Each PCR product was sequenced using the DNA sequencing kit (Applied Biosystem) and the ABI Prism 310 system. Sequence comparisons and alignments were performed with the SeqApp program using ClustalW algorithm.

3. Results

3.1 The number of white papillae per *S. coelicolor* colony drastically increased under an amino acid limitation

In *S. ambofaciens*, we had shown that an amino acid limitation was responsible for an increase of the number of papillae per colony (npc) [24]. Thus, on HT medium, which is usually employed to observe the phenotype and genetic instability of *S. ambofaciens* [37], most of colonies grown 14 days at 30°C exhibited about 10 papillae while all of these colonies harboured more than 50 papillae when grown on HTC7 medium. This medium differs from HT medium by the absence of Bacto tryptone, which constitutes the major source of amino acids. When an amino acids solution was added to the HTC7 medium (named HTC7+aa medium), the npc distribution appeared to be similar to those observed for HT

medium, showing a link between the amino acid concentration and the mutant papillae production.

In order to know whether the same phenomenon existed in *S. coelicolor*, a species which is phylogenetically close to *S. ambofaciens*, the *S. coelicolor* M600 strain, used as a wild-type, was grown 14 days at 30°C on HT, HTC7 and HTC7+aa media. The distributions of the number of papillae per colony were established on a sample of 30 colonies randomly selected (Fig 1). It was observed that the colonies exhibited a higher number of papillae on HTC7 medium (Fig 1B) since most of them displayed between 0 and 15 papillae on HT and more than 50 on HTC7. On the other hand, when the HTC7 medium was supplemented with an amino acid solution (HTC7+aa), the npc distribution was similar to that observed on HT (Fig 1A). Thus, as *S. ambofaciens*, *S. coelicolor* produces white papillae which probably results from genetic instability occurring during the aerial mycelium development and linked to amino acid limitation.

3.2 Mutation in the genes *whiG* and *whiH* in Pig-pap mutants of *S. coelicolor*

In a previous work, we had shown that the *S. ambofaciens* Pig-pap mutants, deriving from a papilla appeared on a colony grown either on HT medium or on HTC7 medium, frequently displayed a mutation in *whiG* gene leading to the inactivation of this gene [24]. In order to elucidate the molecular nature of the Pig-pap mutants of *S. coelicolor*, 6 HT Pig-pap mutants (named 1cpHT to 6cpHT; table 1) and 7 HTC7 Pig-pap mutants (named 1cp7 to 7cp7; table 1) were isolated. The incapacity to sporulate and the absence of large genome rearrangement were checked for eight of them (1cpHT to 4cpHT and 1cp7 to 4cp7). Several genes known to be involved in the first steps of the sporulation process [38] were introduced to try to restore the WT phenotype. Plasmids pSET152(*whiA*), pSET152(*whiB*), pSET152(*whiG*), pSET152(*whiH*) and pSET152(*whiJ*) were therefore used. We observed that

5/6 HT Pig-pap mutants and 6/7 mutants HTC7 Pig-pap mutants presented a WT phenotype after introduction of pSET152(*whiH*) while the Pig-pap mutants 6cpHT and 5cp7 displayed a WT phenotype after introduction of pSET152(*whiG*). The presence of the plasmids in the corresponding exconjugants was checked by hybridizing the corresponding plasmid on *Bam*HI-digested genomic DNA (data not shown).

Sequencing of the gene *whiH* of the 11 Pig-pap mutants which had been complemented by pSET152(*whiH*) was carried out and a mutation was detected. It consisted of a +1 frameshift mutation (addition of a cytosine in a stretch of 6 cytosines at position 972) in 10/11 mutants and of a substitution (replacement of a thymine by a cytosine at position 430) in the last mutant (6cp7) (Fig 2). As shown in Figure 3, the frameshift mutation leads to the absence of the wild-type STOP codon and the elongation of the mutant WhiH protein by 91 amino acids. WhiH belongs to the GntR regulators family and could be active only as dimer [39,40]. The dimerisation could occur in the C-terminal extremity, which was modified in these mutants. Thus, the WhiH protein of these mutants could be inactive.

In the mutant 6cp7, the replacement of a thymine by a cytosine at the position 430 (Fig 2) provokes the replacement of a serine by a proline in position 108 (Fig 3), in the putative helix-turn-helix domain [39]. Consequently, WhiH protein of 6cp7 could be unable to bind to the DNA and unable to repress its target genes.

For the 2 mutants which had been complemented by pSET152(*whiG*), the sequencing of *whiG* gene revealed that only one of the two was mutated in the *whiG* gene. Indeed, a -1 frameshift mutation consisting of a deletion of a cytosine in a stretch of 4 cytosines (nt 222 to 225) was detected in 6cpHT (Fig 4) leading to the synthesis of an aberrant WhiG protein which was truncated and probably inactive since lacking 2.4 and 4.2 regions which are required for the -35 and -10 promoter sequence recognition (Fig 5). No mutation was detected in 5cp7. The search for residual wild spores was undertaken. A great number of colonies of the mutant 5cp7, as well as mutants 1cp7 to 4cp7, for comparison, were grown on HT

medium for 7 days at 30°C. Whereas no grey colony was detected for the 1cp7, 2cp7, 3cp7 and 4cp7 mutants, 491 grey colonies were present among the 5053 colonies of the 5cp7 mutant, which represents a rate of approximately 10%. Thus, whereas the phenotype transferring of 1cp7, 2cp7, 3cp7 and 4cp7 seems stable, the 5cp7 mutant presents a strong percentage of colonies of wild-type phenotype. It is probable that this mutant is in fact a heteroclone, still mixing wild chromosomes, interfering with the sequence of the mutant genome.

Thus, *S. coelicolor* Pig-pap mutants appeared to be very frequently mutated in the gene *whiH* and less frequently in the gene *whiG*. Nevertheless, both of them constitute a target for these genetic instability events which probably occur during the aerial mycelium development to generate papillae and hence Pig-pap mutants.

3.3. *A S. coelicolor relA mutant is unable to produce white papillae*

The stringent response being induced during an amino acid limitation, we tested its implication in the production of white papillae by determining the capacity of the *S. coelicolor relA* mutant M570, which is unable to produce (p)ppGpp and hence to induce the stringent response, to produce papillae. In a first time, we checked the ability of the strain M570 to sporulate when grown on HT medium. After 14 days of growth at 30°C, fragments of colonies of strains M570 and M600 were stained using the Gram reaction and observed by light microscopy. Spores were observed in both strains confirming the capacity of the strain M570 to sporulate in these growth conditions. Hence, the *relA* mutant (M570) was grown on HT, HTC7 and HTC7+aa media for 14 days at 30°C and the distributions of the number of papillae per colony were established on a sample of 30 colonies randomly selected. As seen in figure 6, the colonies of this *relA* mutant harboured very few or no papillae on HT, HTC7 or

HTC7+aa media. When they were present, papillae exhibit? present a very small size. If we assume that the size of one papilla depends on the time when the mutational event occurs during the aerial mycelium formation, such an observation implies that the few mutational events responsible for the small papillae of M570, occurred tardily.

The ability to produce (p)ppGpp was restored in M570 by introducing the plasmid pIJ6084. Such a plasmid contains the *relA* gene fragment coding the (p)ppGpp synthetase activity under the control of the thiostrepton inducible promoter *tipA* [11]. pIJ6084 was introduced in M570 by conjugation and its integration at the *attB* site of the bacteriophage Φ C31 was checked by hybridising this plasmid on *AseI* restriction patterns of genomic DNA of three exconjugants (named M570_{pIJ6084}[1], M570_{pIJ6084}[2] and M570_{pIJ6084}[3]) randomly selected. For each exconjugant, the *tipA* promoter was then induced by adding a disk soaked with a thiostrepton solution near 30 colonies randomly selected and grown 3 days at 30°C on HT or HTC7 media. The distributions of npc were established after 11 additional days of growth. In addition, two controls were performed. They consisted of applying the same treatment to colonies of the strains M570 and M570_{pIJ8600}, which contained the plasmid pIJ8600 (from which pIJ6084 derives). As the npc distributions which were established for the 3 exconjugants containing pIJ6084 after the thiostrepton-dependent *tipA* induction were similar, only that established for the exconjugant M570_{pIJ6084}[1] is presented in the figure 7.

Without *tipA* induction, most of the M570_{pIJ6084}[1] colonies exhibited few papillae which were of small size on HT (Fig 7A) and HTC7 (Fig 7B) media. Conversely, after the induction of (p)ppGpp synthesis through *tipA*, the npc distributions were significantly shifted towards a high number of papillae since the majority of colonies harboured many large white papillae on these two media (Fig 7C and 7D).

The restoration of the capacity of producing white papillae did not result from the presence of the plasmid pIJ8600, from which pIJ6084 derives, nor from thiostrepton induction. Indeed, any papilla was not detected after addition of a disk containing a

thiostrepton solution near the colonies of the strains M570 and M570_{pIJ8600} (fig 7E). Thus, it appeared that the restoration of papillae production observed after induction of *tipA* in the 3 exconjugants containing pIJ6084 resulted from induction of (p)ppGpp synthesis. Finally, it was shown that a residual transcription starting from the *tipA* promoter could exist, which could make it possible to explain the presence of few papillae on the colonies of the 3 exconjugants in absence of *tipA* thiostrepton induction [11] (Fig 7B).

To conclude, these results strongly suggested that the (p)ppGpp synthesis and hence the stringent response was implicated in the papillae production in *S. coelicolor*.

3.4. Characterization of Pig-pap mutants derived from M570_{pIJ6084}

To check that Pig-pap mutants deriving from the papillae produced by M570_{pIJ6084}[1], M570_{pIJ6084}[2] and M570_{pIJ6084}[3] strains after the induction of *tipA* with thiostrepton, had the same characteristics than the Pig-pap mutants described above, three papillae deriving from three independent mutational events, since derived from each of the 3 exconjugants, were sub-cloned until obtaining homogenous mutant populations. They were named M570_{pIJ6084}[1]pap, M570_{pIJ6084}[2]pap and M570_{pIJ6084}[3]pap. These mutants were white, unable to sporulate after 7 days of growth on HT medium, and no large genome rearrangement was detected on their respective genomic *AseI* restriction pattern. Complementation experiments showed that 2/3 were complemented by introducing pSET152(*whiH*) while the WT phenotype of the last was restored by introducing pSET152(*whiG*). Sequencing of endogenous *whiG* and *whiH* genes of these 3 mutants was carried out. Concerning the mutants M570_{pIJ6084}[1]pap and M570_{pIJ6084}[3]pap, whose the phenotype was complemented by the introduction of pSET152(*whiH*), a -1 frameshift mutation (deletion of a guanine at the position 857) (Fig 2) leading to the synthesis of a WhiH protein with an aberrant and truncated C-terminal extremity (Fig 3) was detected in the gene *whiH* of the first mutant. The second mutant

presented a frameshift +1 mutation in *whiH* gene (addition of a cytosine in a stretch of 6 cytosines) as observed previously in other Pig-pap mutants (see above and Fig 2). Finally, the strain M570_{pIJ6084}[2]pap, whose the phenotype was complemented by pSET152(*whiG*), was mutated in the *whiG* gene : 33 nucleotides (position 319 to 351 ; Fig 4), i.e. 11 amino acids (Fig 5), were deleted in the 3' extremity of σ^{whiG} region 1.

Therefore, the Pig-pap mutants which were produced after restoration of the (p)ppGpp synthesis appeared to be mutated in the same genes than the Pig-pap mutants which were produced by the WT strain M600.

4. Discussion

In this paper, we showed that *S. coelicolor*, like *S. ambofaciens*, produced white mutant papillae which probably result from genetic instability events occurred during the aerial mycelium development. If the Pig-pap mutants deriving from the *S. coelicolor* papillae are unable to sporulate and devoid of large genome rearrangements, like those produced by *S. ambofaciens*, they were more frequently mutated in the *whiH* gene than in the *whiG* gene. In *S. ambofaciens*, all of the Pig-pap mutants which have been characterised can be complemented by the introduction of one copy of *whiG* and a great proportion of them display mutations in this gene [24,30]. For 10/11 *S. coelicolor whiH* Pig-pap mutants, the mutation consists in a frameshift +1, leading to the synthesis of a WhiH protein longer of 91 amino acids than the wild-type WhiH protein. The eleventh mutant presented a substitution of an amino acid in the Helix-Turn-Helix domain. In all of the cases, such mutations could lead to inactive WhiH protein, either by the impossibility of forming a dimer, or by the impossibility of binding to DNA. One *S. coelicolor* Pig-pap mutant displayed a *whiG* frameshift mutation which probably leads to the synthesis of an inactive σ^{whiG} lacking 2.4 and 4.2 regions, as it was already observed in *S. ambofaciens*. Although, the difference in frequency of mutation in

the *whiG* and *whiH* genes observed between *S. ambofaciens* and *S. coelicolor* might result from a selection inside the colony, it could nevertheless reflect a real difference between the 2 species. Under amino acid limitation, high number of mutants affected in *whiG* or *whiH* genes are produced in *S. coelicolor*. However, the ratio of the mutants complemented by *whiH* gene introduction (5/6 from HT and 6/7 from HTC7) and those complemented by *whiG* gene introduction (1/6 from HT and 1/7 from HTC7) is not significantly different according to the culture medium on which they were generated. Thus, the amino acids limitation seems not create a new class of mutants but amplify a phenomenon already observed on HT medium. The pattern of mutation in *whiG* and *whiH* of *S. coelicolor* and *S. ambofaciens* mutants previously described in [24] highlights the fact that the majority of mutation are frameshift, as noticed for stationary phase mutations [41].

We observed that the *S. coelicolor relA* mutant M570, unable to produce (p)ppGpp, was unable to produce such papillae and that the restoration of the (p)ppGpp synthesis permitted the restoration of papillae production. Such papillae gave rise to Pig-pap mutants similar to those described previously in *S. coelicolor* WT strain. Thus, two of the three analyzed mutants presented a mutation in *whiH* gene and the third a mutation in *whiG* gene. These results suggest that stringent response is implicated in papillae production and thus in the instability of the *whiG* and *whiH* genes during the aerial development. If the increase of the number of papillae under an amino acid limitation do not result from a selection, such results raise to question about the molecular mechanisms which modify the mutation rate of the genes *whiH* and *whiG* and how the stringent response could interfere in such a mechanism. Induction of stringent response could increase in a global way or a targeted way the mutation rate. In *E. coli*, (p)ppGpp activates *rpoS* and RpoS-regulon. This brings to the expression of error-prone polymerases as PolIV and PolV, and the inactivation of MMR system, and leads to a global increase of mutation rate. Besides, stringent response could affect more particularly several genes, as those required for aminoacids biosynthesis. Thus it

has been shown that an increase in transcription rate is directly linked to an increase in mutation rate due to the fact that the non-transcribed strand, which is under a single-strand form during transcription process, is more vulnerable to hydrolysing reaction leading to the creation of abasic sites [1]. If we assume that only certain genes like *whiG* and *whiH* are affected in *Streptomyces*, then, the increase of their mutation rate under an amino acid limitation could result from an increase of their transcription in these growth conditions, increase which could be under the control of the stringent response.

Acknowledgements

We are grateful to Pr Mervyn Bibb for kindly providing M570 strain and pIJ6084 plasmid and to Dr Eriko Takano for M600 strain. Many thanks to Céline Fourier for her technical assistance in sequencing experiments. This work was supported by "Le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

Références bibliographiques

- [1] B.E. Wright, A. Longacre and J.M. Reimers Hypermutation in derepressed operons of *Escherichia coli* K12, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 5089-5094.
- [2] T.M. Wendrich, G. Blaha, D.N. Wilson, M.A. Marahiel and K.H. Nierhaus Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA, *Mol Cell* 10 (2002) 779-788.
- [3] D. Chatterji and A.K. Ojha Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling, *Curr Opin Microbiol* 4 (2001) 160-165.
- [4] V. Jain, M. Kumar and D. Chatterji ppGpp: stringent response and survival, *J Microbiol* 44 (2006) 1-10.
- [5] V.J. Hernandez and H. Bremer *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires spoT, *J Biol Chem* 266 (1991) 5991-5999.

- [6] D.R. Gentry and M. Cashel Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation, *Mol Microbiol* 19 (1996) 1373-1384.
- [7] U. Mechold, H. Murphy, L. Brown and M. Cashel Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*, *J Bacteriol* 184 (2002) 2878-2888.
- [8] T.M. Wendrich and M.A. Marahiel Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*, *Mol Microbiol* 26 (1997) 65-79.
- [9] O.H. Martinez-Costa, M.A. Fernandez-Moreno and F. Malpartida The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities, *J Bacteriol* 180 (1998) 4123-4132.
- [10] B.Z. Harris, D. Kaiser and M. Singer The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *myxococcus xanthus*, *Genes Dev* 12 (1998) 1022-1035.
- [11] J. Sun, A. Hesketh and M. Bibb Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J Bacteriol* 183 (2001) 3488-3498.
- [12] S. Autret, A. Levine, F. Vannier, Y. Fujita and S.J. Seror 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 (1999) 1665-1679.
- [13] P. McGlynn and R.G. Lloyd Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression, *Cell* 101 (2000) 35-45.
- [14] L.U. Magnusson, A. Farewell and T. Nystrom ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*, *Trends Microbiol* 13 (2005) 236-242.
- [15] C.E. Vrentas, T. Gaal, W. Ross, R.H. Ebright and R.L. Gourse Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA, *Genes Dev* 19 (2005) 2378-2387.
- [16] Touloukhonov, II, I. Shulgina and V.J. Hernandez 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 (2001) 1220-1225.
- [17] D.R. Gentry, V.J. Hernandez, L.H. Nguyen, D.B. Jensen and M. Cashel Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp, *J Bacteriol* 175 (1993) 7982-7989.

- [18] A. Teich, S. Meyer, H.Y. Lin, L. Andersson, S. Enfors and P. Neubauer Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators sigmaS and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*, *Biotechnol Prog* 15 (1999) 123-129.
- [19] M. Jishage, K. Kvint, V. Shingler and T. Nystrom Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp, *Genes Dev* 16 (2002) 1260-1270.
- [20] R. Chakraborty and M. Bibb The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation, *J Bacteriol* 179 (1997) 5854-5861.
- [21] O.H. Martinez-Costa, P. Arias, N.M. Romero, V. Parro, R.P. Mellado and F. Malpartida A *relA*/*spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes, *J Biol Chem* 271 (1996) 10627-10634.
- [22] S. Hoyt and G.H. Jones *relA* is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*, *J Bacteriol* 181 (1999) 3824-3829.
- [23] S.G. Kang, W. Jin, M. Bibb and K.J. Lee Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture, *FEMS Microbiol Lett* 168 (1998) 221-226.
- [24] M. Genay, S. Catakli, A. Kleinclauss, A. Andrieux, B. Decaris and A. Dary Genetic instability of *whiG* gene during the aerial mycelium development of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 under different conditions of nitrogen limitations, *Mutat Res* 595 (2006) 80-90.
- [25] A. Dary, P. Martin, T. Wenner, B. Decaris and P. Leblond DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control, *Biochimie* 82 (2000) 29-34.
- [26] T.G. Pridham, P. Anderson, C. Foley, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesseltine and R.G. Benedict A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*, *Antibiot Annu* (1956-1957) 947-953.
- [27] D.A. Hopwood, M. Bibb, K. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf Genetic manipulation of *Streptomyces* : A Laboratory Manual, Norwich, 1985.
- [28] D.J. MacNeil, K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. MacNeil Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector, *Gene* 111 (1992) 61-68.

- [29] J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis Molecular Cloning : A Laboratory Manual, NY, 1989.
- [30] S. Catakli, A. Andrieux, B. Decaris and A. Dary Sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of a mutational phenomenon occurring during aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877, *Res Microbiol* 156 (2005) 328-340.
- [31] W.J. Dower, J.F. Miller and C.W. Ragsdale High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 6127-6145.
- [32] S. Catakli, A. Andrieux, P. Leblond, B. Decaris and 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.
- [33] P. Martin, A. Dary and 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.
- [34] G. Fischer, B. Decaris and 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.
- [35] P. Demuyter, P. Leblond, B. Decaris and J.M. Simonet Characterization of two families of spontaneously amplifiable units of DNA in *Streptomyces ambofaciens*, *J Gen Microbiol* 134 (1988) 2001-2007.
- [36] P. Leblond, G. Fischer, F.X. Francou, F. Berger, M. Guerineau and 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.
- [37] P. Leblond, P. Demuyter, L. Moutier, M. Laakel, B. Decaris and J.M. Simonet Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*, *J Bacteriol* 171 (1989) 419-423.
- [38] K.F. Chater Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?, *Curr Opin Microbiol* 4 (2001) 667-673.
- [39] N.J. Ryding, G.H. Kelemen, C.A. Whatling, K. Flardh, M.J. Buttner and 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.

- [40] S. Rigali, A. Derouaux, F. Giannotta and J. Dusart Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies, *J Biol Chem* 277 (2002) 12507-12515.
- [41] M. Kivisaar Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress, *Environ Microbiol* 5 (2003) 814-827.

10

11

12

13

LEGENDS

Table 1

S. coelicolor strains used in this work.

Table 2

Nucleotide sequence of primers used in this work. These sequences were deduced from the *S. coelicolor* genome sequence which is available in the GeneBank database. The annealing temperatures used for the PCR reactions are indicated. The localisation of the different primers is indicated in the figures 4 and 5.

Figure 1

Distributions of the number of papillae per colony (npc) of *S. coelicolor* M600 strain grown 14 days at 30°C on HT (A), HTC7 (B) and HTC7+aa (A) media. For each medium, 30 colonies were randomly selected and their number of papillae determined. Npc values were grouped together by classes of 5. The number of colonies (Col. number) observed for each class is shown on the Y-axis. On part A, the photograph shows a representative phenotype observed among the colonies grown on HT medium and on part B, on HTC7 medium.

Figure 2

S. coelicolor *whiH* gene sequence, localisation of oligonucleotides used to amplify the different portions of this gene (marked by arrows) and position of mutation in Pig-pap strains. Nucleotides in bold characters belong to *whiH* ORF and the start and stop codons are framed. The -35, -10 and rbs regions are overlined. Position of mutation detected in 6cp7 (C), M570_{pIJ6084}[1]pap (-1G) and the 11 other Pig-pap mutants (+1C) is indicated.

Figure 3

End-to-end alignment of WhiH of 6cp7, M570_{pIJ6084}[1]pap and the 11 other Pig-pap mutants (noted WhiH other mutants) and *S. coelicolor* M600 strain. The alignment was made using the BioEdit software. Black boxes indicate similar residues between the sequences of the Pig-pap mutant and M600 and white boxes residues which differ. The star (*) indicates a stop codon. The helix-turn-helix motif is indicated.

Figure 4

S. coelicolor *whiG* gene sequence, localisation of oligonucleotides used to amplify the different portions of this gene (marked by arrows) and position of mutation in Pig-pap strains. Nucleotides in bold characters belong to *whiG* ORF and the start and stop codons are framed. Position of mutation detected in 6cpHT (-1C) and M570_{pIJ6084}[2]pap (-33nt underlined) is indicated.

Figure 5

End-to-end alignment of WhiG of 6cpHT and *S. coelicolor* M600 strain. The alignment was made using the BioEdit software. Black boxes indicate similar residues between the sequences of 6cpHT and M600 and white boxes residues which differ. The star (*) indicates a stop codon. The different regions of σ^{whiG} are indicated by arrows. Framed amino acids are deleted in M570_{pIJ6084}[2]pap strain.

Figure 6

Distributions of the number of papillae per colony (npc) of the *relA* mutant (*S. coelicolor* M570 strain) grown 14 days at 30°C on HT, HTC7 and HTC7+aa media. For each medium, 30 colonies were randomly selected and their number of papillae determined. Npc values were grouped together by classes of 5. The number of colonies (Col. number) observed for each class is shown on Y-axis. On part A, the photograph shows a representative phenotype observed among the colonies grown on HT medium.

Figure 7

Distributions of the number of papillae per colony (npc) of *S. coelicolor* M570_{pIJ6084}[1] grown 14 days at 30°C on HT (A and C) and HTC7 (B and D) media with (C and D) or without (A and B) thiostrepton induction. E. Distributions of npc of controls M570_{pIJ8600} and M570 grown 14 days at 30°C on HTC7 medium with thiostrepton induction at 3 days of growth. For each medium, 30 colonies were randomly selected and their number of papillae determined. Npc values were grouped together by classes of 5. The number of colonies (Col. number) observed for each class is shown on Y-axis. On parts A and B, the photographs show representative phenotypes of colonies with few papillae. On parts C and D, the photographs show representative phenotypes of colonies with high number of papillae. On part E, the photograph shows a representative phenotype of M570_{pIJ8600} grown on HTC7 medium.

<i>S. coelicolor</i> strains	Origin	Reference
M600	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Weaver <i>et al.</i> , 2004
M570 (<i>relA</i> ⁻)		Chakraborty and Bibb, 1997
M570 _{pIJ6084} [1] M570 _{pIJ6084} [2] M570 _{pIJ6084} [3]	Three exconjugants of strain M570 containing the plasmid pIJ6084 which was integrated at the <i>attB</i> site of ϕ C31	This work
M570 _{pIJ6084} [1]pap M570 _{pIJ6084} [2]pap M570 _{pIJ6084} [3]pap	Papillae derived from independent mutational events appeared on colonies of the three exconjugant M570 _{pIJ6084} [1],[2], [3], grown on HTC7 medium after a thiostrepton-dependent induction of (p)ppGpp synthesis	
1c7 2cp7 3cp7 4cp7 5cp7 6cp7 7cp7	Papillae derived from independent mutational events appeared on M600 colonies grown on HTC7 medium	
1cpHT 2cpHT 3cpHT 4cpHT 5cpHT 6cpHT	Papillae derived from independent mutational events appeared on M600 colonies grown on HT medium	

Table 1

Primer	Sequence of the primer	Annealing temperature (°C)
G1	CGAGTGATCACCCAGAGC	55
G2	TGATCTCCCGGTCGACGT	55
G3	ACGCTCGACGAGCTGTGG	55
G4	GGCGGTGTCCTCCAGGGT	55
G5	GTGGAGGACCTCCACGCG	55
G6	GCACGCTGCATCGACCGG	55
H1	AGCGATCACCCCTTTCGTG	55
H2	GGATCCAGCAGGTTCCAG	55
H3	ATCGGACAGCGTTTCGAG	55
H4	GGGGTGGACGGTCAGAAG	55
H5	CTCTCCGGCATCGTCTCC	55
H6	GTGAACGGCGTCCGTATT	55

Table 2

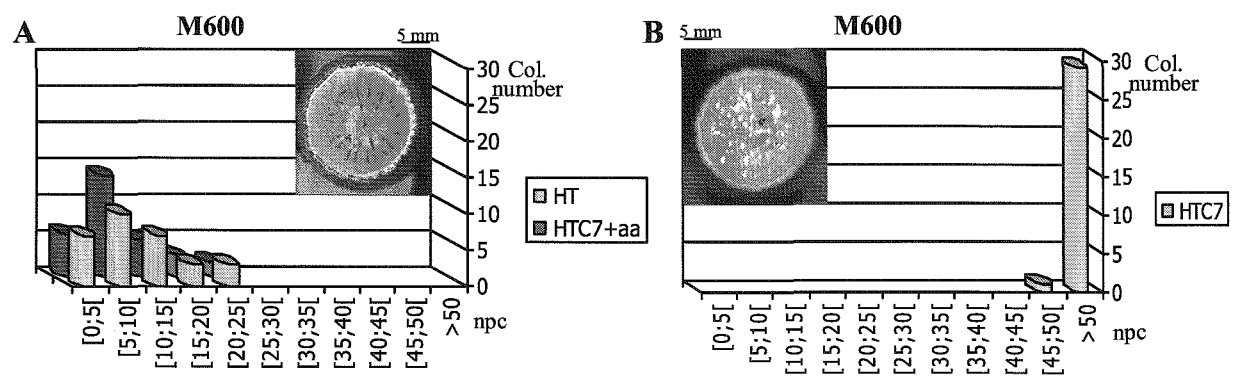


Figure 1

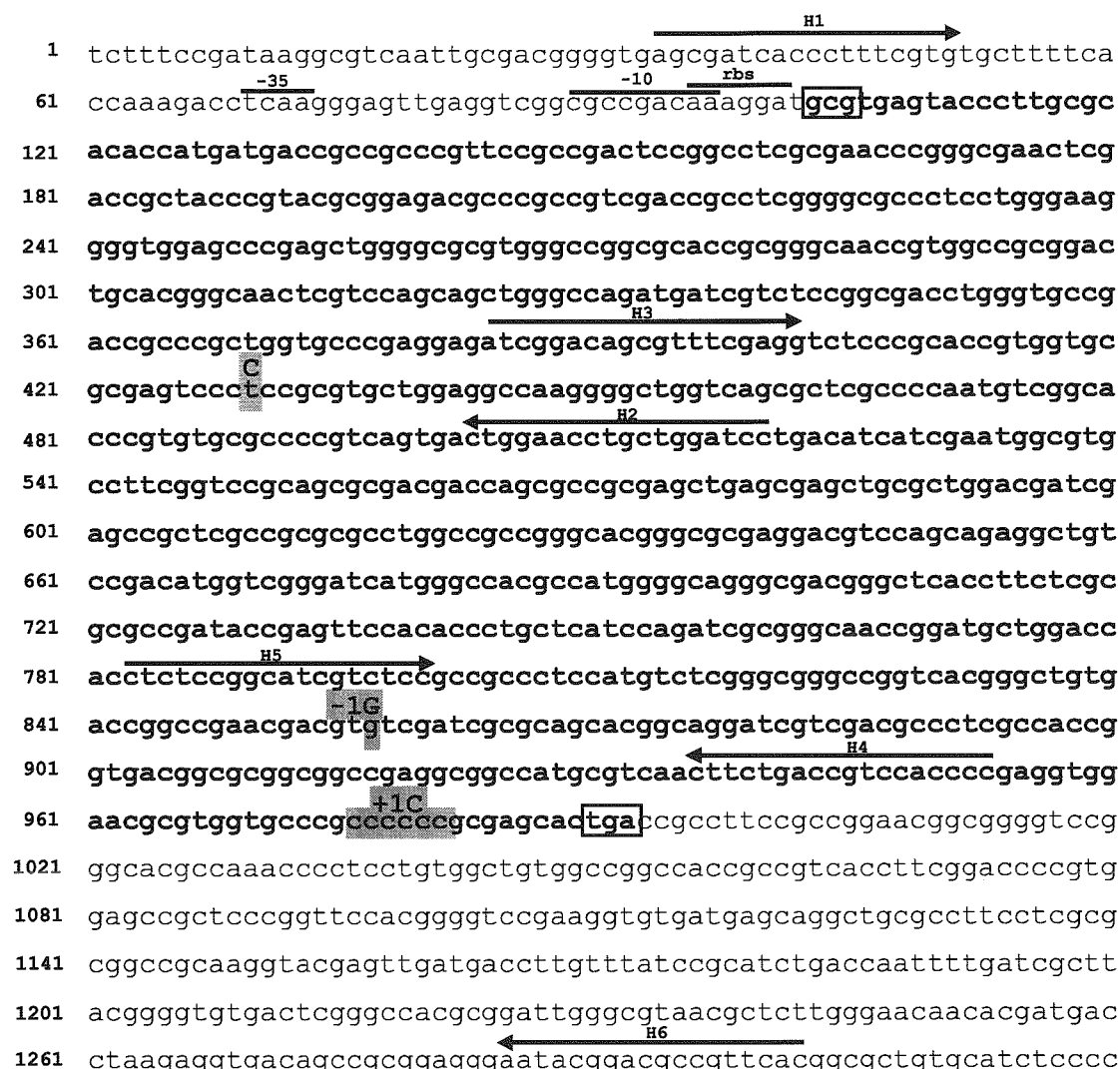


Figure 2

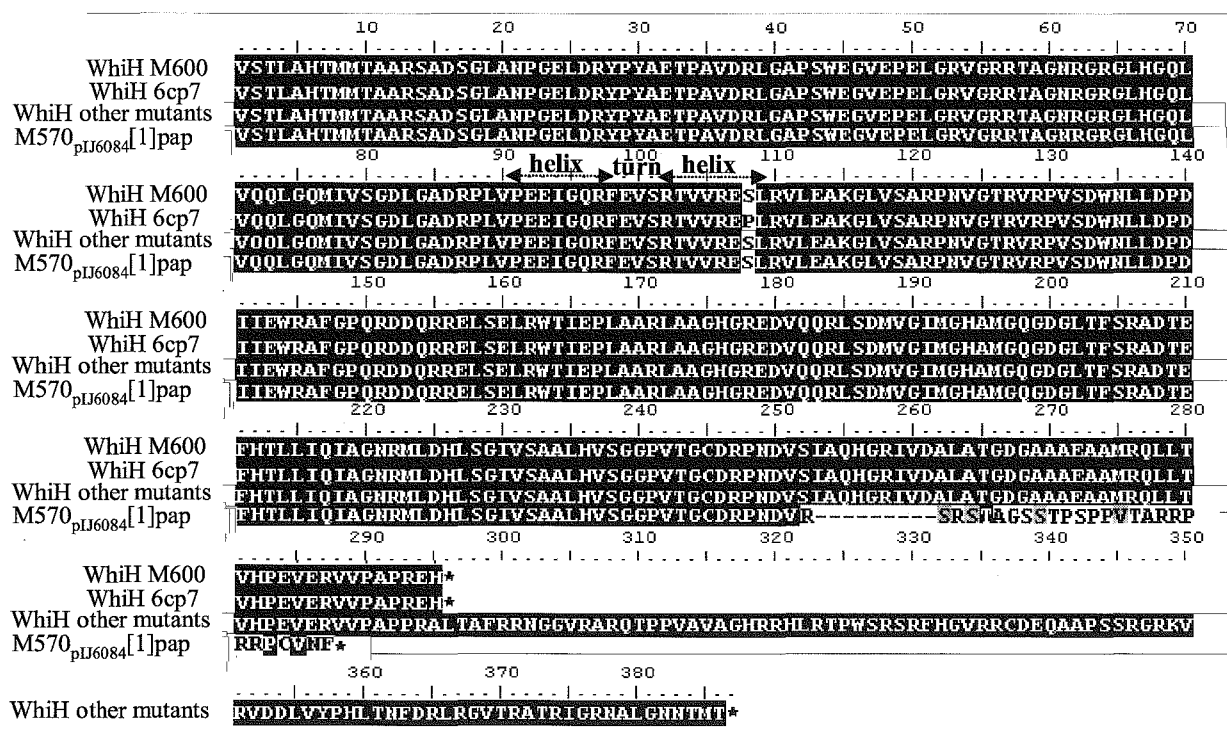


Figure 3

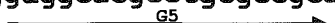
1  **G1**
 1 gagtgatcaccagagcgatcatcgccccctgtagagcggttcggcggaacgtatctgc
 61 gtaggggtgccacccccctccttcgcacaccgcgacagtcacgtacgctacgctacgat
 121 gacccccacgcagacggccgacagcacgacgacaaccagaaagcagacccggcggcctcagg
 181 cagatccacatcacggcagaacggcactagggcgacga  **-1C** **atgccccagcacacctccgggtc**
 241 **cgaccgggcggcgatccccccagccgcccgcgacgggtggcagcgtgcgaccgcccgc**
 301  **G3** **-33nt** **ctcgacgctcgacgagctgtggcggtcgtacaagacgacccggcgacgagcggtgcggga**
 361 **acagctgatcctgcactactcgccccctcgtgaagtacgtggcgggccgggtcagcgtggg**
 421 **actgcccgaatgtcgagcagggcgacttcgtctcctccgggggtgttcggcctgatcga**
 481  **G2** **cgccatcgagaagttcgacgtcgaccgggagatcaagttcgagacgtacgcgatcaccg**
 541 **gatccggggcgcgatgatcgacgaactgcgggcgctggactggatcccgcggtcgggtgcg**
 601 **gcagaaggcgcgcaacgtggagcgcgctacgcgacgctggaggcacgcctgcgcccgcac**
 661  **G5** **tccctcggagagcgaggtcgccgtggagatggggatcgcggtggaggacctccacgcggt**
 721 **cttcagccagttgtcgctggccaacgtcgtggccctggaggaactgctgcacgcgggcgg**
 781  **G4** **cgagggcgggcgccggctcagcctgatggacaccctggaggacaccgccgcgacaacc**
 841 **ggtggaggtcgccgaggaccgtgagctgcggcggtcctggccccgggcgatcaacacgct**
 901 **gccggagcgcgagaagaccgtcgtcacgctgtactactacgagggcctcacgctcgccga**
 961 **gatcgggaacgtgctgggtgtgaccgagagcagggtcagccagatccacaccaagtccgt**
 1021 **gttgcaactgcgcgccaaacttgccgggtttcgcccgctga**  **ctgggcttacggcacgggc**
 1081 **ccggccccaccgcgggccgggtcggaccacggcgccggctgagtgactcccgctccggg**
 1141 **gtgccgcgtccgtaaagtgggtgacgtgccaaaggattcgagcggcctctgtggccgagcac**
 1201  **G6** **cggtcgatgca**

Figure 4

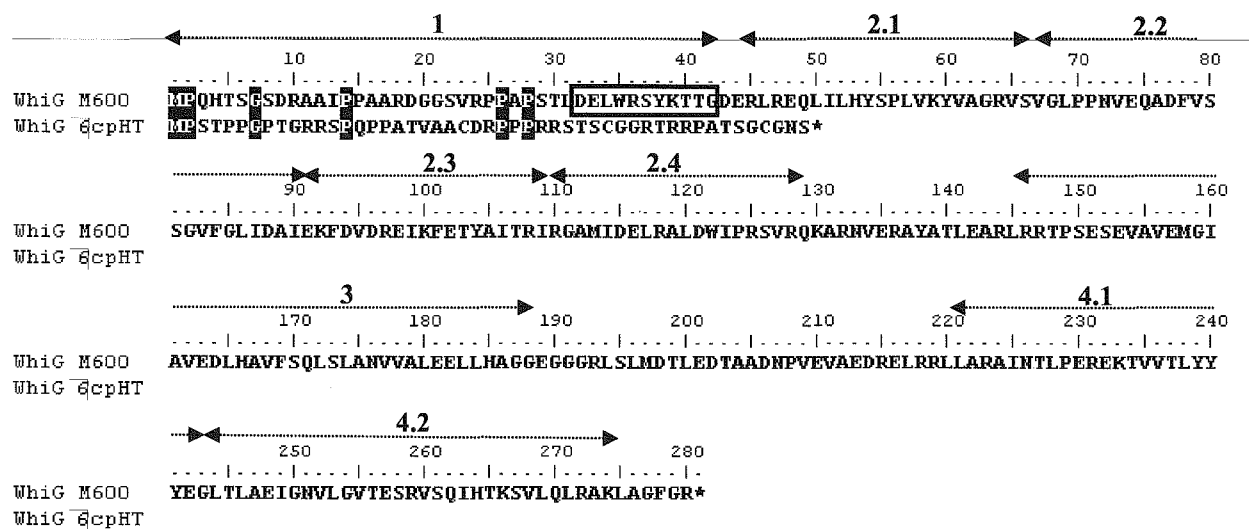


Figure 5

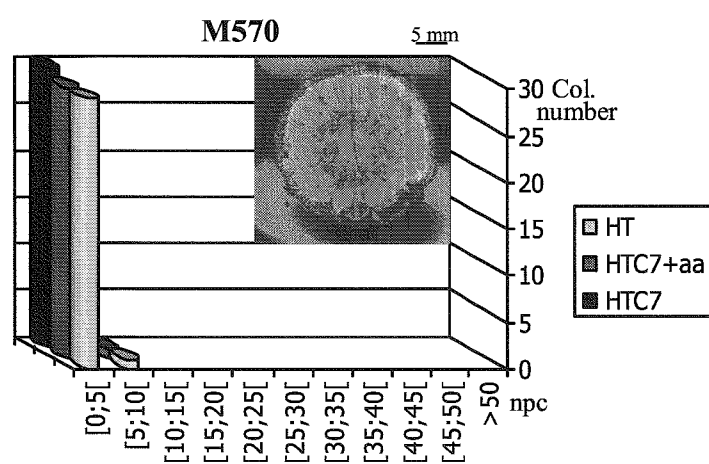


Figure 6

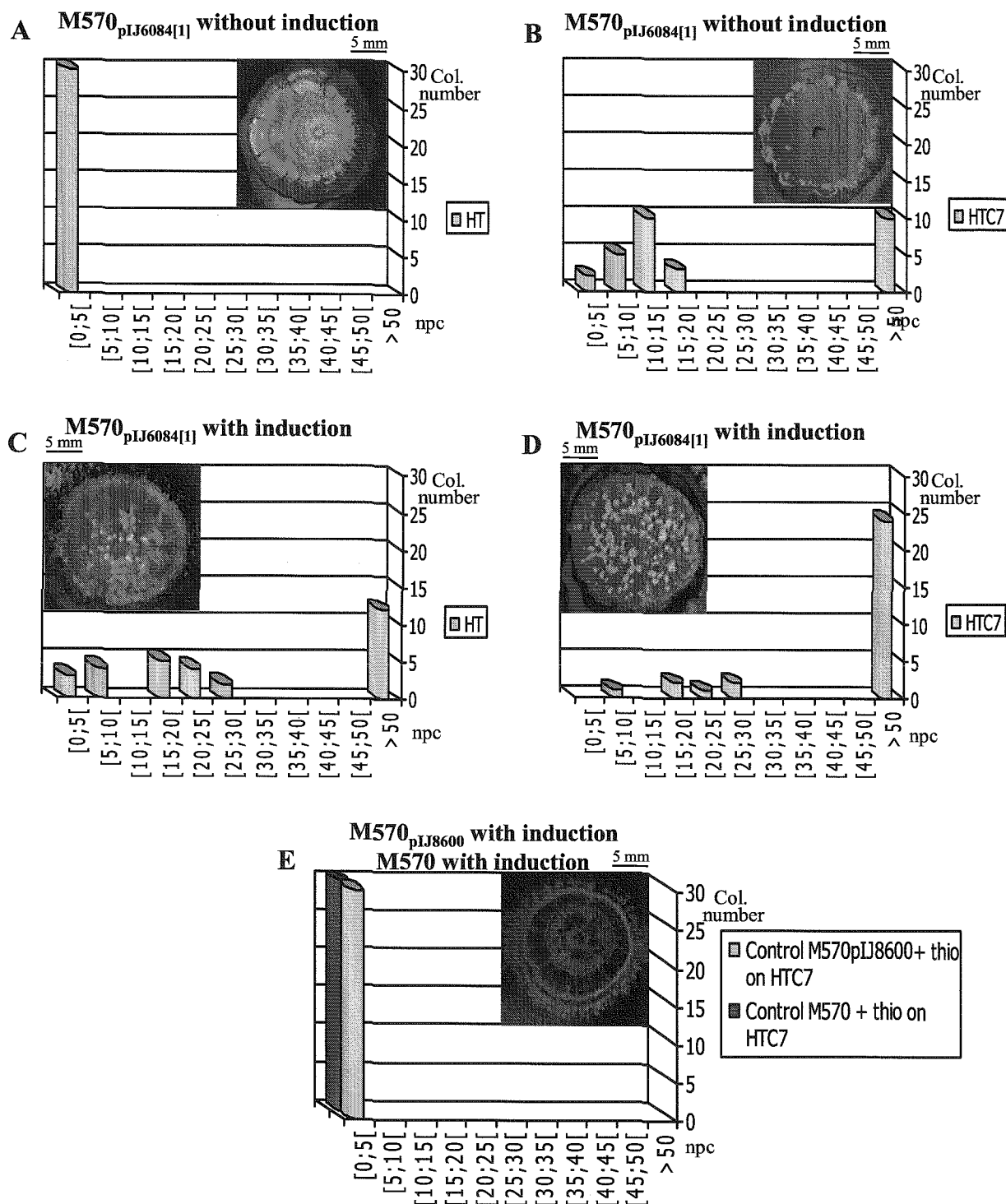


Figure 7

5 Communications orales

Communication orale n°1 :

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.

Rencontres du Club des Actinomycètes, Liège, 6 et 7 mai 2004.

Communication orale n°2 :

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

Instabilité génétique des gènes *whiG* et *whiH* lors du développement de *Streptomyces ambofaciens* et *Streptomyces coelicolor* : implication de la réponse stringente.

Rencontres du Club des Actinomycètes, Ecully, 14 et 15 juin 2006.

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 complémentée 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.

Instabilité génétique des gènes *whiG* et *whiH* lors du développement de *Streptomyces ambofaciens* et *S. coelicolor* : implication de la réponse stringente.

Magali Genay, Sibel Catakli, Annie Dary et Bernard Decaris

Laboratoire de Génétique et Microbiologie-UMR INRA 1128 – IFR 110-Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Les événements d'instabilité génétique survenus lors du développement du mycélium aérien conduisent chez *Streptomyces ambofaciens* et *S. coelicolor* à des papilles mutantes blanches non sporulantes. En effet, les mutants qui en sont issus, appelés mutants Pig⁻pap, sont bloqués dans les premières étapes du processus de sporulation. La plupart possède au moins une mutation inactivant les gènes *whiG* (codant un facteur sigma indispensable à la sporulation) ou *whiH* (codant un répresseur transcriptionnel dont la transcription dépend de σ^{WhiG}). Dans la plupart des cas, il s'agit de mutations frameshift. La recherche de facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la production de papilles sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* nous a permis de montrer que la limitation en acides aminés provoque une augmentation (d'un facteur supérieur à 10) du nombre de papilles par colonie. La caractérisation des mutants issus de telles papilles a révélé qu'ils étaient pour la plupart mutés dans les gènes *whiG* ou *whiH*, montrant l'influence d'une limitation en acides aminés sur la variation de la mutabilité de ces 2 gènes. La réponse stringente est la réponse physiologique mise en place lors d'une limitation en acides aminés via le gène *relA*, qui permet la synthèse de ppGpp. Nous avons testé la capacité d'un mutant *relA* de *S. coelicolor* à former des papilles mutantes dans des conditions classiques de culture (milieu complet) ou dans des conditions de limitation en acides aminés. Dans les deux situations, aucune papille n'a été observée sur les colonies de ce mutant. Par contre, l'introduction du gène *relA*, sous contrôle du promoteur *tipA*, restaure la capacité à former des papilles mutantes. La caractérisation moléculaire de certains mutants Pig⁻pap, issus de ces papilles, a révélé qu'ils présentaient des mutations dans les gènes *whiH* ou *whiG*. Ces résultats mettent en évidence un lien entre réponse stringente et variation du taux de mutation chez *S. coelicolor*, taux qui n'est pas constant au cours du développement de cette bactérie.

Discussion

L'objectif de cette étude a été d'exploiter une observation phénoménologique, le caractère modulable de la production de papilles mutantes, pour répondre à une question fondamentale, à savoir si le milieu de culture pouvait influencer la production de ces papilles chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* donc influencer sur le taux de mutation et donc l'instabilité génétique à certains moments du développement de ces espèces bactériennes. L'étude phénotypique de colonies cultivées sur différents milieux nutritifs, variant par leurs concentrations en différents éléments, a permis de mettre en évidence que la composition du milieu de culture, notamment la concentration en acides aminés, était un modulateur du taux de mutation.

Lors d'une limitation en acides aminés, le nombre de papilles mutantes produites à la surface des colonies augmente et ces papilles donnent naissance à des mutants souvent mutés dans *whiG* chez *S. ambofaciens* et dans *whiH* ou *whiG* chez *S. coelicolor*. Ces travaux ont ainsi permis d'identifier deux gènes affectés par l'augmentation de la mutabilité : les gènes *whiG* et *whiH*, deux régulateurs (un facteur σ et un répresseur transcriptionnel) intervenant dans la cascade de sporulation, c'est-à-dire à un stade précis du développement des *Streptomyces*.

L'augmentation de la production de papilles sur milieu limité en acides aminés nous a amenés à tester l'implication de la réponse stringente dans la modulation du taux de mutation. L'étude d'un mutant *relA* de *S. coelicolor*, incapable de déclencher la réponse stringente puisqu'incapable de synthétiser du (p)ppGpp, a montré qu'il ne produisait pas de papilles mutantes à la surface de ses colonies. La réponse stringente semble donc jouer un rôle dans la mutabilité de *Streptomyces*, notamment au niveau des gènes *whiG* et *whiH*.

Comme les gènes *whiG* et *whiH* sont les seuls à avoir été identifiés, lors de ce travail, comme cible de l'instabilité génétique lors d'une limitation en acides aminés, la question qui se pose est de comprendre si dans de telles conditions environnementales, l'augmentation du taux de mutation est ciblée à quelques gènes dont *whiG* et *whiH* ou si l'identification de 2 cibles de l'instabilité reflète une augmentation globale du taux de mutation du génome. En effet, la sélection phénotypique exercée sur le caractère papille pourrait favoriser la détection de telles mutations, sans refléter un ciblage de la mutabilité au niveau de ces gènes. De plus, la différence de fréquence de mutations dans les gènes *whiG* et *whiH* entre les 2 espèces de *Streptomyces* pourrait résulter d'une sélection phénotypique différente du caractère papille chez ces 2 espèces ou refléter une différence interspécifique au niveau des cibles de la réponse stringente lors d'une limitation en acides aminés.

Ces résultats permettent de s'interroger sur l'influence de la réponse stringente sur la stabilité du génome de *Streptomyces*. Cette réponse physiologique bien étudiée chez *E. coli* l'est moins chez

Streptomyces. Un lien entre réponse stringente et différenciation morphologique et physiologique, notamment au niveau de la production d'antibiotiques, y a été établi. Les résultats que nous apportons montrent que la réponse stringente a une influence sur l'instabilité génétique donc sur le taux de mutation. Ce type de lien est encore peu connu dans le monde bactérien. Au-delà du monde *Streptomyces*, ces résultats montrent que des conditions nutritives fréquemment rencontrées dans la vie d'une bactérie peuvent être à l'origine d'une variabilité de la mutabilité et ainsi agir sur la dynamique, le polymorphisme et l'évolution des populations. Les papilles étant produites en réponse à une limitation en acides aminés, nous pouvons nous interroger sur le rôle, s'il y en a un, de ces papilles au sein d'une colonie. Elles pourraient, par exemple, conférer un avantage adaptatif à la colonie tout entière lors de conditions de croissance non favorables.

1 Les mutants Pig⁻pap, un nouvel outil pour étudier la stabilité des génomes

L'instabilité génétique décrite chez *S. ambofaciens* affecte notamment la pigmentation des colonies, phénomène se manifestant par l'apparition de colonies à secteurs dépigmentés, à papilles dépigmentées ou entièrement dépigmentées. Ces différentes colonies mutantes ont d'abord été considérées comme issues d'un même type d'événement mutationnel mais survenu à un stade différent du développement de la colonie. Ainsi, les secteurs proviendraient d'un événement mutationnel lors du développement du mycélium végétatif, les papilles lors du développement du mycélium aérien et les colonies dépigmentées lors de la formation des spores. L'analyse de plus d'une centaine de mutants issus de ces 3 catégories a permis de montrer que les mutants Pig⁻pap présentaient des caractéristiques qui leur étaient propres. Contrairement aux 2 autres types de mutants, ils ne présentaient aucun réarrangement chromosomique de grande taille et étaient phénotypiquement homogènes, c'est-à-dire blancs et non sporulants, contrairement aux mutants issus de secteurs (Pig⁻sec) ou de colonies (Pig⁻col) dépigmentés, dont la pigmentation et la sporulation étaient plus ou moins affectées (Martin *et al.*, 1999). La caractérisation plus fine de 3 d'entre eux a montré qu'en plus des caractéristiques précitées, ils étaient complémentables par le gène *whiG* de *S. coelicolor*, suggérant qu'ils étaient bloqués très tôt au cours du processus de sporulation. L'observation de fragments de colonies de ces mutants en microscopie électronique à balayage a confirmé cette hypothèse, révélant des hyphes aériens droits dépourvus de spores (Figure 53) (Catakli *et al.*, 2005).

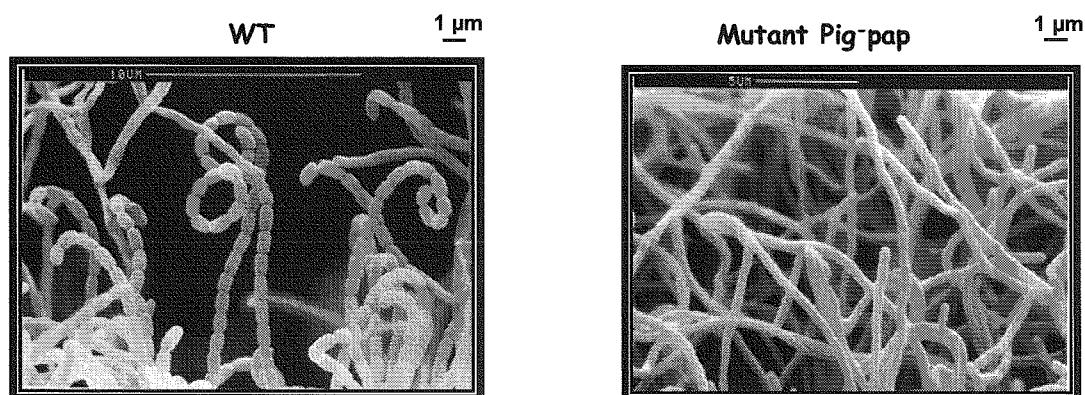


Figure 53 : Photographies obtenues en microscopie électronique à balayage du mycélium aérien de la souche sauvage de *S. ambofaciens* ATCC23877 et d'un mutant Pig⁻pap (Catakli *et al.*, 2005). Alors que la souche sauvage présente des chaînettes de spores bien différenciées et enroulées, le mutant Pig⁻pap présente des hyphes aériens droits.

Dans ce travail, l'analyse de 30 mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* et de 13 mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*, issus de différents milieux de culture, a conforté ces caractéristiques, c'est-à-dire que tous les mutants analysés, qu'ils soient issus de *S. ambofaciens* ou *S. coelicolor*, étaient dépigmentés, ne produisaient plus de spores et ne présentaient pas de grands réarrangements génomiques.

Des travaux antérieurs ont montré qu'il pourrait exister un lien entre stade de développement des *Streptomyces* et fréquence de réarrangement. En effet, les mutants Pig⁻sec de *S. ambofaciens*, qui seraient produits lors du développement du mycélium végétatif, donc en conditions nutritives non limitantes et en croissance rapide, présentaient fréquemment des réarrangements au niveau des extrémités chromosomiques (6 à 37 % des mutants suivant le sous-clone sauvage étudié) ; les mutants Pig⁻col, qui seraient produits lors du processus de sporulation, c'est-à-dire dans une situation de faible croissance et de carence nutritive, présentaient un taux de réarrangements jusqu'à 10 fois supérieur à celui des mutants Pig⁻sec (33 à 83 % des mutants suivant le sous-clone sauvage étudié). L'hypothèse proposée est que la diversification provoquée par ces réarrangements au sein d'une population pourrait contribuer à la survie de l'espèce (Dary *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1999). En revanche, les mutants Pig⁻pap ne présentent pas de grands réarrangements chromosomiques, ni ceux caractérisés dans des travaux antérieurs, ni ceux analysés dans ce travail. L'instabilité chromosomique observée chez les mutants Pig⁻sec et Pig⁻col semble donc absente au moment de la production de papilles, correspondant à la formation du mycélium aérien.

De plus, dans ce travail, l'analyse moléculaire de mutants Pig⁻pap a révélé qu'une mutation dans les gènes *whiG* ou *whiH*, gènes intervenant dans les premières étapes de processus de

sporulation, était fréquemment présente. En effet, sur les 30 mutants Pig⁻ pap de *S. ambofaciens*, au moins 13 présentaient une mutation dans le gène *whiG*, mutation de type substitution d'une paire de bases ou frameshift + ou -1. Sur les 13 mutants de *S. coelicolor* analysés, 11 présentaient une mutation de type substitution d'une paire de bases ou frameshift + ou -1 dans le gène *whiH* et un présentait une mutation frameshift -1 dans le gène *whiG*. La délétion la plus importante en taille a été détectée dans le gène *whiG* d'un mutant Pig⁻ pap issu de la souche de *S. coelicolor* M570_{pIJ6084}[2], chez lequel 33 nucléotides de ce gène étaient délétés.

Ce travail a donc permis de mettre en évidence un autre type d'instabilité génétique, de nature plus discrète, que celle habituellement décrite chez *Streptomyces*. En effet, la principale manifestation de l'instabilité génétique détectée chez *Streptomyces* est la présence de grandes délétions, parfois associées à l'amplification de séquences adjacentes. La région affectée est quasi-exclusivement située aux extrémités des bras chromosomiques. Les gènes présents dans cette région sont des gènes dispensables, intervenant notamment dans la production de métabolites secondaires, la morphologie ou la pigmentation des colonies. C'est par exemple le cas chez *S. ambofaciens*, espèce chez laquelle le quart du génome, au niveau des extrémités des bras chromosomiques, peut être délété sans que la viabilité du mutant ne soit affectée (Leblond *et al.*, 1991). Chez *S. glaucescens*, de nombreux caractères sont fréquemment mutés, comme les loci *strS*, intervenant dans la production d'hydroxystreptomycine, et *melC*, codant une tyrosinase, car présents dans une région sujette à des événements de délétion (Birch *et al.*, 1990).

Le génome des *Streptomyces* contient de nombreux éléments génétiques, tels que des phages tempérés, des éléments transposables ou des plasmides intégratifs, pouvant entraîner une instabilité, notamment en conditions de stress. En effet, il a été montré, d'abord chez le Maïs, puis chez les bactéries et la Drosophile, que la transposition d'éléments transposables en tout endroit du génome pouvait être à l'origine d'une forte instabilité génétique (McClintock, 1950; Slatko and Hiraizumi, 1975). Chez *S. lividans*, des transposons, comme *Tn4811*, peuvent être responsables de réarrangements chromosomiques (Volff and Altenbuchner, 2000).

Les mutants Pig⁻ pap constituent donc un nouvel outil de l'étude de la stabilité des génomes de *Streptomyces*, dans la mesure où leur instabilité génétique n'est pas corrélée, du moins de façon visible, à une instabilité chromosomique. Les gènes *whiG* et *whiH* affectés chez ces mutants ne font pas partie de la région instable, région dans laquelle avait été identifiée la quasi-totalité des événements de réarrangements chromosomiques détectés chez les *Streptomyces*. Enfin, l'intervention d'éléments transposables est peu plausible puisque toutes les mutations détectées

dans le génome de ces mutants sont de type discrètes car ponctuelles ou quasi-ponctuelles (inférieures à 33 nucléotides).

2 Les mutants Pig⁻pap sont fortement produits lors d'une limitation en acides aminés

Des expériences antérieures réalisées chez *S. ambofaciens* avaient montré que la production de papilles, et donc de mutants Pig⁻pap, était influencée par des facteurs génétiques et environnementaux. D'une part, il a été montré que le caractère « nombre de papilles par colonie » était héritable, puisque des colonies à faible nombre de papilles donnaient majoritairement naissance à des colonies à faible nombre de papilles alors que des colonies à grand nombre de papilles donnaient principalement naissance à des colonies à grand nombre de papilles (Martin *et al.*, 1998). D'autre part, il a été observé que le milieu de culture avait une influence sur la production de papilles chez *S. ambofaciens* (Volff, 1994).

2.1 Une limitation en acides aminés augmente la mutabilité

Ces observations nous ont amenés à étudier plus en détail l'influence du milieu nutritif sur la production de papilles : la conception de différents milieux variant par leur concentration en différents éléments nutritifs a permis de mettre en évidence que la concentration en acides aminés était le facteur qui influençait le plus fortement la production de papilles sur les colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. Après 14 jours de croissance, les colonies cultivées sur un milieu pauvre en acides aminés présentaient un nombre de papilles nettement supérieur à celui observé sur milieu complet, suggérant que les papilles seraient produites en réponse à une limitation nutritionnelle. Ainsi, sur les milieux pauvres en acides aminés, ces derniers s'épuiseraient plus rapidement que sur milieu complet et les papilles apparaîtraient plus tôt et/ou en plus grand nombre sur les colonies cultivées sur de tels milieux. Ceci signifie d'une façon plus générale qu'une limitation nutritive, qui n'est pas une condition mutagène en tant que telle et qui peut être envisagée comme une situation récurrente dans la vie d'une bactérie, modifie la stabilité du génome.

2.2 Rôle des acides aminés dans une cellule

Les acides aminés sont essentiels à la croissance d'une bactérie et interviennent dans les différents processus métaboliques. Il a par exemple été montré que l'absence d'un seul acide aminé essentiel était suffisante pour bloquer non seulement la synthèse protéique, mais également la synthèse d'acides nucléiques, puisqu'en cultivant des colonies sur un milieu dépourvu d'acides aminés, l'incorporation d'adénine était inhibée dans la demi-heure suivant la carence exercée (Gale and Folkes, 1958). Une limitation en acides aminés est donc un stress pour une bactérie, qui devient incapable de mener à bien les processus de réplication, transcription et traduction. La baisse de capacité d'incorporation de bases constitue ainsi un facteur mutagène. D'autre part, de nombreux acides aminés présentent des caractéristiques structurales similaires à des intermédiaires du cycle tricarboxylique de Krebs et peuvent intervenir dans ce processus métabolique. Par exemple, la désamination de la Sérine permet la formation de pyruvate (Weil, 1983). Ainsi, un mauvais fonctionnement du cycle de Krebs par manque d'acides aminés essentiels peut être mutagène à cause du déficit énergétique empêchant les processus métaboliques d'être menés à bien.

La déplétion en acides aminés dans le milieu représente donc une condition critique pour une bactérie puisque de nombreux processus cellulaires ne peuvent plus être accomplis.

2.3 Autres types de carences nutritives augmentant la mutabilité

D'autres types de carences peuvent également aboutir à une augmentation du taux de mutation et être ainsi considérées comme mutagènes. Chez *E. coli*, une carence en phosphate provoque la synthèse de (p)ppGpp *via* l'activité (p)ppGpp synthétase de la protéine SpoT. Outre une modification du métabolisme cellulaire, cette activation va entraîner une augmentation du taux de mutation par des interactions moléculaires qui seront décrites par la suite (cf. paragraphe 4.3). Une carence en glucides, par exemple en galactose ou en arabinose, est également à l'origine d'une augmentation globale du taux de mutation de phase stationnaire (Bjedov *et al.*, 2003). Par exemple, chez *Enterobacter arogenes*, la ribitol déshydrogénase n'est pas capable d'utiliser comme substrat le xylitol. Lors d'une carence en ribitol et en présence de xylitol, une augmentation du taux de mutation est observée, résultant par exemple en une ribitol déshydrogénase capable d'utiliser le xylitol comme substrat à la place du ribitol (Wright, 2000).

Il apparaît donc qu'une limitation en sources nutritives constitue un facteur de mutabilité pour la cellule, résultant en une augmentation du taux de mutation, dont des mutations délétères et

neutres, mais également des mutations à forte valeur adaptative, augmentant la probabilité de survie.

2.4 Rôle des papilles : une diversification de la population ?

La diversification des populations bactériennes influence de façon directe le taux de survie. Ainsi, de nombreux exemples de diversification des populations, en permettant une organisation moléculaire différente, comme lors de l'établissement d'un biofilm, ou en présentant différents types de cellules dans des états physiologiques différents, ont été identifiés et contribuent à la survie de la population. Par exemple, au sein d'une population d'*E. coli*, il existe des cellules très résistantes à certains stress mais peu capables de capter les nutriments du milieu et d'autres qui possèdent une forte affinité pour les nutriments mais des niveaux de résistance faibles (Ferenci, 2005). Ces variations graduelles au sein d'une population résultent principalement du polymorphisme présent au niveau des gènes codant des porines et le facteur σ^S . Ce type d'adaptation se fait donc par diversification de la population, c'est-à-dire qu'une population d'*E. coli* contient des bactéries avec un large spectre de capacités métaboliques donc un plus large spectre de réponses à l'environnement et ainsi une plus forte probabilité de survie de la population. La diversification d'une population peut également contribuer à la survie d'un individu en tant que tel au sein de cette population. Il a ainsi été montré que lorsqu'*E. coli* était cultivée en milieu limité en glucose pendant un grand nombre de génération, la présence de plusieurs clones polymorphes stables était observée (Rosenzweig *et al.*, 1994). L'un des clones était capable d'assimiler rapidement le glucose et de produire de l'acétate en faible concentration. Un autre clone était capable d'assimiler l'acétate produit par le premier. Dans ce type d'exemple, la diversification de la population d'*E. coli* permet la survie de l'individu en tant que tel, par mise en place d'une alimentation croisée au sein de la population.

Il est possible d'envisager qu'au sein d'une colonie de *Streptomyces* se déroule un phénomène similaire à ce qui est observé au sein d'une population d'*E. coli*, c'est-à-dire qu'il pourrait exister différents types de coenocytes variant par leurs propriétés métaboliques et présents en concentrations différentes en fonction de l'environnement. Les papilles pourraient ainsi constituer un type de coenocytes, incapables de se reproduire car non sporulants, mais par exemple capables d'assimiler mieux certains nutriments dans un environnement pauvre en acides aminés. Elles seraient le résultat d'une diversification au sein d'une colonie. Une analyse transcriptomique pourrait permettre de mettre en évidence des différences de métabolisme entre des mutants Pig⁻ pap

et une souche sauvage. D'autre part, il serait intéressant de comparer les profils de différents mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* et *S. ambofaciens* variant par leur nature moléculaire (cf paragraphe 3) de manière à déterminer si le métabolisme est identique quelle que soit la nature du mutant Pig⁻pap considéré. D'autre part, il a été montré que le processus de différenciation d'une colonie de *Streptomyces* impliquait une régulation complexe, passant par un stade de lyse du mycélium végétatif pour permettre le développement du mycélium aérien. Ce processus se rapproche de ce qui est décrit dans les cas de mort cellulaire programmée (Ohnishi *et al.*, 2002). La papille pourrait être en fait une forme de sénescence au sein de la colonie lors d'un stress nutritif et conférer un avantage adaptatif en permettant par exemple à la colonie tout entière d'économiser de l'énergie nécessaire au processus de sporulation. Une autre hypothèse est qu'elles ne confèrent pas un avantage adaptatif mais qu'elles aient pour origine des mutations neutres ou délétères produites en parallèle.

2.5 Type de mutabilité engendrée par une limitation en acides aminés

Alors que des travaux antérieurs avaient montré que des souches mutatrices de *S. ambofaciens* à grand nombre de papilles donnaient naissance dans leur descendance à des colonies dépigmentées (Pig⁻col) à des fréquences élevées et à des colonies à secteurs (Pig⁺sec) à des fréquences similaires à celles d'une souche sauvage (Martin *et al.*, 1998), l'observation dans ce travail de colonies de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* n'a pas révélé de fortes augmentations de fréquence de production de secteurs ou de colonies dépigmentées sur milieu limité en acides aminés. Cela signifie qu'une limitation en acides aminés affecte l'instabilité génétique mais peu ou pas l'instabilité chromosomique. Cependant, cette observation ne permet pas d'exclure que la mise en place d'un état mutateur dans de telles conditions ne pourrait pas entraîner également une instabilité chromosomique, se manifestant par l'apparition, dans la descendance de colonies à grand nombre de papilles cultivées sur milieu limité en acides aminés, de colonies à secteurs dépigmentés ou de colonies dépigmentées.

De plus, l'établissement de cet état mutateur correspondrait à un stade précis du développement, affectant les mutants Pig⁻pap produits lors de la formation du mycélium aérien mais affectant peu ou pas les mutants Pig⁻col et Pig⁻sec produits aux stades mycélium végétatif et sporulation.

3 Les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont mutés dans les gènes *whiG* ou *whiH*

3.1 Les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens*

Le nombre de papilles observées sur milieu limité en acides aminés était plus important que celui observé sur milieu HT. La question qui se posait était d'une part quel(s) gène(s) étai(en)t affecté(s) dans les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* et d'autre part si les mutants dérivant de papilles obtenues sur milieux limités en acides aminés (HTC) présentaient les mêmes caractéristiques que ceux dérivant de papilles obtenues sur milieu HT, c'est-à-dire s'ils pouvaient être issus du même phénomène moléculaire. Afin de répondre à ces questions, nous avons dans un premier temps complété le phénotype de 4 mutants issus de papilles obtenus sur des milieux limités en acides aminés en introduisant le plasmide pSET152(*whiG*), puis séquencé leur gène *whiG*. Trois de ces mutants présentaient une mutation dans l'ORF *whiG* et le 4^{ème} une substitution dans la séquence rbs. Les mutants Pig⁻pap « HT » caractérisés antérieurement ne présentant pas de mutation dans leur gène *whiG*, nous avons choisi d'augmenter l'échantillon en isolant 16 mutants Pig⁻pap « HT » et 10 mutants Pig⁻pap « HTC » de *S. ambofaciens*. L'analyse par SSCP d'un fragment de 205 pb en 5' du gène *whiG* a révélé que 5 des 16 mutants Pig⁻pap « HT » et 4 des 10 mutants Pig⁻pap « HTC » analysés présentaient une mutation dans ce fragment. La complémentation du phénotype des 17 autres mutants a montré que dans tous les cas l'introduction du plasmide pSET152(*whiG*) permettait un retour au phénotype sauvage. Ces mutants peuvent présenter une mutation ailleurs dans le gène *whiG* ou appartenir à la classe de mutants Pig⁻pap caractérisés antérieurement, chez lesquels le gène *whiG* n'est pas muté et est transcrit, mais le gène *whiH*, dont la transcription dépend de σ^{WhiG} , n'est pas transcrit. Il s'agirait ainsi d'une modification de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle de *whiG*.

La combinaison des résultats obtenus par Catakli *et al.* (2005) et de ceux obtenus dans ce travail montre que sur milieu complet HT, et peut-être sur milieu HTC, les 2 types de mutants peuvent être produits chez *S. ambofaciens* : la classe A, correspondant à des mutants mutés dans le gène *whiG* et la classe B, correspondant à des mutants chez lesquels le gène *whiG* n'est pas muté mais la protéine WhiG serait inactive.

Afin d'expliquer la nature de ces 2 classes de mutants, notamment ceux de la classe B, il est important de souligner que le phénotype Pig⁻pap est héritable et stable (taux de réversion inférieur à

5.10^{-5}), nous obligeant à plutôt considérer un mécanisme mutationnel et non une modification temporelle et transitoire de l'expression génique.

Dans le cas des mutants de la classe A, l'héritabilité du phénotype et la restauration de la cascade de sporulation par introduction d'une copie supplémentaire du gène *whiG* sont aisément explicables.

Dans le cas des mutants de la classe B, une trop faible quantité de ce facteur ou sa séquestration sont envisageables. Cette trop faible quantité pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité protéolytique visant σ^{WhiG} ou la surproduction d'un facteur dirigeant σ^{WhiG} vers la voie protéolytique. En effet, de nombreux facteurs σ sont régulés par protéolyse (Arsene *et al.*, 2000; Zhou and Gottesman, 1998). D'autre part, de nombreux exemples de facteurs anti- σ , et même de facteurs anti-anti- σ , régulant de façon spatiale et/ou temporelle l'activité des facteurs σ en les séquestrant, ont été démontrés, comme les facteurs σ^F et σ^B de *B. subtilis*, contrôlés respectivement par les facteurs anti- σ SpoIIAB / anti-anti- σ SpoIIAA et anti- σ RsbW / anti-anti- σ RsbV (Hilbert and Piggot, 2004). Chez *S. ambofaciens*, les facteurs σ^{B_L} et σ^{B_R} , dupliqués car présents dans les répétitions terminales inversées du chromosome, sont régulés par un anti- σ , PrsL, et un anti-anti- σ , ArsR (Roth *et al.*, 2004). Une mutation dans le facteur anti- σ de WhiG, le rendant plus actif, ou au contraire rendant moins actif un potentiel facteur anti-anti- σ pourrait expliquer le phénomène observé dans ces mutants *Pig⁻pap*. Cependant, le séquençage complet du génome de *S. coelicolor* n'a révélé aucun gène susceptible de coder un facteur anti- σ^{WhiG} (Bentley *et al.*, 2002). Enfin, il a été montré que la production d'ARN antisens pouvait réguler négativement l'activité d'un facteur σ , comme par exemple *oxyS* qui inhibe la traduction de l'ARN messager *rpoS* chez *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002a). Dans un tel cas, la protéine WhiG ne pourrait plus être produite et des expériences de Western-blot pourraient permettre de déterminer si l'expression de WhiG est bloquée de façon post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle.

D'autre part, la complémentation du phénotype mutant chez cette classe de mutant pourrait s'expliquer par une augmentation du nombre de protéines WhiG produites, grâce à la présence de 2 copies du gène. Cette augmentation pourrait pallier les éventuels phénomènes de séquestration par un facteur anti- σ ou de protéolyse, permettant la présence de quantité suffisante de protéines WhiG actives pour mener à bien le processus de sporulation.

3.2 Les mutants *Pig⁻pap* de *S. coelicolor*

Sept mutants *Pig⁻pap* « HTC » et 6 « HT » ont été isolés à partir de la souche sauvage M600 de *S. coelicolor*. L'analyse par SSCP du fragment de 205 pb qui avait révélé un fort taux de

mutation dans le gène *whiG* des mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* a été réalisée et aucune différence de migration des monobrinns d'ADN de 205 pb n'a été observée entre les 13 mutants analysés et la souche sauvage. Le séquençage du gène *whiG* de 5 des 7 mutants Pig⁻pap « HTC » a confirmé l'absence de mutation dans ce gène. Des expériences de complémentation du phénotype des 13 mutants ont révélé que la grande majorité des mutants Pig⁻pap (11/13) étaient complémentables par pSET152(*whiH*) alors qu'une minorité (2/13) étaient complémentables par pSET152(*whiG*). Le séquençage des gènes *whiG* et *whiH* a été réalisé chez ces 13 mutants et a révélé que les 11 mutants Pig⁻pap dont le phénotype était complémenté par pSET152(*whiH*) étaient mutés dans le gène *whiH* et que 6cpHT, dont le phénotype était complémenté par pSET152(*whiG*), était muté dans le gène *whiG*. Le mutant 5cp7 ne présentait ni mutation dans *whiG* ni dans *whiH* et pourrait être un hétéroclone. Ainsi, la poursuite de son étude n'a pas été réalisée.

Il existerait donc chez *S. coelicolor* 2 types de mutations aboutissant au phénotype Pig⁻pap, la plupart localisée dans le gène *whiH* et certaines dans le gène *whiG*. Ce type de situation diffère de celle rencontrée chez *S. ambofaciens*, espèce chez laquelle le gène *whiG* semble constituer l'unique cible mutationnelle détectée chez les mutants Pig⁻pap. Cependant, le gène principalement affecté chez *S. coelicolor* reste un des gènes intervenant dans les premières étapes du processus de sporulation. Il semblerait donc que lors d'une limitation en acides aminés, que ce soit chez *S. ambofaciens* ou *S. coelicolor*, des gènes intervenant dans le processus de sporulation, notamment *whiG* et *whiH*, soient sujets à de forts taux de mutations. Ces mutations pourraient présenter une valeur adaptative élevée, c'est-à-dire qu'il existerait un avantage au sein d'une colonie à présenter des cellules non capables de sporuler dans de telles conditions environnementales.

3.3 Influence du milieu de culture sur la nature des mutants Pig⁻pap

Alors que sur les 3 mutants Pig⁻pap « HT » de *S. ambofaciens* que Catakli *et al.* (2005) avaient analysés, aucun ne présentait de mutation dans le gène *whiG*, les expériences de SSCP réalisées dans ce travail ont révélé que ce n'était pas le cas pour tous : presque un tiers (5/16) des mutants Pig⁻pap « HT » étudiés présentait une mutation dans le fragment de 205 pb en 5' du gène *whiG*. Les mêmes expériences de SSCP réalisées sur 10 mutants Pig⁻pap « HTC » ont permis de détecter une mutation dans ce fragment pour 4 d'entre eux. Ainsi, le ratio de mutants mutés et non mutés dans le gène *whiG* sur milieu complet et limité en acides aminés ne semble pas significativement différent, ce qui suggère que sur milieu limité en acides aminés, le nombre de

mutants Pig⁻pap produits est plus important mais que leur nature par rapport au milieu complet n'est pas différente.

La même observation a été réalisée pour la souche M600 de *S. coelicolor*, chez laquelle la quasi-totalité, sinon tous (en considérant 5cp7 comme étant un hétéroclone), des mutants Pig⁻pap « HTC » et la quasi-totalité (5/6) des mutants Pig⁻pap « HT » présentaient une mutation dans le gène *whiH*. Le mutant 6cpHT présentait quant à lui une mutation dans le gène *whiG*. Le ratio de mutants mutés dans *whiG* ou *whiH* n'est pas significativement différent entre les mutants issus de milieu complet HT et les mutants issus de milieu limité en acides aminés. Ceci suggère que, comme chez *S. ambofaciens*, le milieu de culture influence le nombre de mutants produits, mais pas la nature de ces mutants.

Ainsi, les mécanismes mutationnels mis en jeu dans les 2 cas sont probablement les mêmes. Les papilles apparaîtraient sur milieu HT en réponse à une limitation nutritionnelle, qui correspond au stade du développement du mycélium aérien, et ce phénomène aurait lieu plus tôt et/ou de façon plus importante dans un milieu contenant à la base une concentration moindre en nutriments.

3.4 Etude de la nature des mutations

3.4.1 Spectre de mutations de type frameshift et substitution

Chez *E. coli*, le spectre de mutations observé chez des souches déficientes dans le système de réparation MMR consiste en 75 % de substitutions, dont la quasi-totalité sous forme de transition, et 25 % de frameshift (Leong *et al.*, 1986; Schaaper and Dunn, 1987). Si le lien exclusif entre déficience du système MMR et production de mutations en phase stationnaire de croissance n'a pas encore été clairement démontré chez *E. coli* (Foster, 1999; Harris *et al.*, 1999), des études réalisées chez d'autres espèces bactériennes ont montré que les mutations produites en phase stationnaire de croissance présentaient un spectre différent de celui des mutations qui se déroulent lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Par exemple, chez *P. putida*, la mutation dominante est la transversion cytosine en adénine lors des premiers jours de carence nutritive, puis elle est remplacée par des mutations frameshift, telles que des petites délétions de 2 ou 3 pb (Saumaa *et al.*, 2002). Chez cette espèce bactérienne, le spectre de mutations a été comparé entre un mutant délété du système MMR et une souche sauvage cultivée sur un milieu limité en glucose, afin de savoir si la baisse d'activité du système MMR lors de conditions de stress pouvait directement

être incriminée dans l'apparition de mutations de phase stationnaire (Saumaa *et al.*, 2006). Alors que la majorité des mutations détectées chez la souche déficiente pour le système MMR consistait en des substitutions, des mutations de type frameshift étaient plus souvent observées chez la souche cultivée en conditions de stress en glucose, suggérant l'implication d'autres mécanismes que le dysfonctionnement du système MMR dans la formation de mutations de phase stationnaire. L'intervention de polymérases « error-prone » pourrait par exemple être responsable d'une partie des mutations de phase stationnaire. C'est le cas de la polymérase polIV chez *P. putida* (Tegova *et al.*, 2004).

Les mutations détectées dans ce travail et affectant les gènes *whiG* et *whiH* de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* sont majoritairement de type frameshift. En effet, sur les 11 mutants de *S. ambofaciens* dont le gène *whiG* a été entièrement séquencé, 7 présentent une mutation frameshift alors que les 4 autres présentent pour 2 d'entre eux une transversion et pour les 2 derniers une transition. Sur les 11 mutants de *S. coelicolor* dont le gène *whiH* a été entièrement séquencé, 10 présentent une mutation frameshift et une transition. Un dernier mutant de *S. coelicolor* présente une mutation frameshift dans le gène *whiG*. Il est possible d'envisager que chez *Streptomyces*, l'activation de polymérases « error-prone » pourrait être responsable de la production d'une partie des mutations produites en phase stationnaire. La recherche d'une polymérase « error-prone » dans le génome séquencé de *S. coelicolor* A3(2), accessible *via* le site du National Center of Biotechnology Information, a été effectuée et a révélé la présence d'une polymérase polIV, peu processive, « error-prone » et impliquée dans la mutagenèse non ciblée. Elle permettrait la réplication de l'ADN au niveau des fourches de réplication bloquées en outrepassant les mésappariements. Une limitation en acides aminés pourrait induire des changements métaboliques au sein de la cellule de *Streptomyces* et l'activation de voies et de régulateurs particuliers dont pourrait faire partie ce type de polymérases.

D'autre part, il est intéressant de réaliser un parallèle entre le type de mutations observées chez *P. putida* et celles détectées dans les mutants analysés dans ce travail. Il semble exister une corrélation entre type de mutations et moment de la carence nutritive où elles sont apparues puisque chez *P. putida*, les mutations frameshift semblent remplacer les mutations de type substitution plus la condition de carence nutritive se prolonge. Ceci pourrait signifier qu'en fonction du moment où la papille apparaît sur une colonie de *Streptomyces*, le type de mutation affectant les gènes *whiG* ou *whiH* pourrait être différent. Au début du développement du mycélium aérien, la limitation nutritive est récente et les mutations qui apparaîtraient seraient plus de type substitution, comme chez les mutants WT8pap4, WT12pap7, 9papHT et 16papHT, alors que plus tard dans l'érection du

mycélium aérien, les mutations affectant les gènes *whiG* et *whiH* seraient plutôt de type frameshift. Cette observation pourrait ainsi permettre de « dater » le moment d'apparition de ce type de mutant au sein d'une colonie de *Streptomyces*. Ceci implique également qu'une corrélation pourrait exister entre taille des papilles, moment d'apparition et type de mutation. Ainsi, plus une papille serait apparue tôt, plus elle apparaîtrait grosse, et ces papilles seraient majoritairement issues d'un événement mutationnel de type substitution survenu tôt dans le stade de développement. Plus tard dans le développement de la colonie apparaîtraient d'autres papilles, phénotypiquement plus petites que les précédentes, et elles auraient pour origine principalement des mutations de type frameshift. L'isolement de mutants issus de papilles de différentes tailles et le séquençage de leur gène *whiG* ou *whiH* pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

Cette hypothèse implique également que le mode de régulation et les mécanismes mutationnels qui se mettent en place sont fonction du stade de développement d'une colonie. Par exemple, lors des premières phases de limitation nutritionnelle, l'inhibition du système de réparation post-réplcatif serait la principale cause des mutations produites, de type substitution, puis l'activation d'autres mécanismes tels que l'action de polymérases « error-prone » serait à l'origine de mutations de type frameshift.

Ainsi, le caractère « papille » pourrait constituer un outil très intéressant pour étudier la succession des mécanismes mutationnels susceptibles de se mettre en place lors du développement de *Streptomyces*.

3.4.2 Mutation perte de fonction

De nombreux exemples ont montré que la perte du facteur σ^S ou du régulateur Lrp chez *E. coli* présentait un avantage adaptatif et que des mutants *rpoS* ou *lrp* avaient un phénotype « GASP » (Growth Advantage in Stationary Phase) en phase de non croissance (Zinser and Kolter, 2000). Cet avantage a été expliqué par le fait que ces mutants étaient capables de métaboliser de nouvelles substances par rapport à une souche sauvage, donc d'occuper une nouvelle niche écologique, bien qu'ils présentaient un taux de résistance aux stress plus faible qu'une souche sauvage. Par exemple, les mutants « GASP » *lrp* présentent une augmentation du catabolisme de la sérine, de la glycine et de la thréonine, de l'expression des enzymes intervenant dans la néoglucogénèse et dans la voie Pentose-Phosphate (Tal, Tkt, FbaB) et une induction de gènes codant des protéines impliquées dans la résistance aux stress osmotique (*osmC*, *osmY*, *osmB*, *osmE*)

et acide (*gadA*, *gadBC*, *sodC*) (Tani *et al.*, 2002). De tels mutants seraient plus aptes qu'une souche sauvage à récupérer les nutriments provenant des cellules mortes voisines.

Le gène *whiG* code un facteur σ -alternatif et il est possible d'imaginer que la perte de ce régulateur ait une conséquence favorable sur la valeur adaptative de la colonie. WhiH est également un régulateur, souvent négatif, et son inactivation pourrait conférer également un avantage puisqu'il ne pourrait alors plus aller activer ou réprimer ses gènes cibles. Cependant, il est délicat de réaliser un parallèle entre les gènes *whiG/whiH* et *rpoS/lrp*, compte tenu de l'absence de similitudes connues entre leurs gènes cibles respectifs. En effet, alors que σ^S et Lrp présentent de nombreux points communs au niveau de leurs gènes cibles (par exemple *osmY*, *osmB*, *osmC*, *osmE* ou *sodC*) (Hengge-Aronis, 2002b; Lacour and Landini, 2004; Tani *et al.*, 2002), les seuls gènes cibles identifiés pour σ^{whiG} sont 3 gènes connus pour intervenir uniquement dans la cascade de sporulation et un gène codant une protéine ProX-like intervenant dans la réponse au stress osmotique (Chater and Chandra, 2006; Tan *et al.*, 1998). Il s'agit de *whiH*, *whiI*, *sigF* (chez *S. aureofaciens*) et *orfTH4*. La seule cible de WhiH actuellement identifiée, hormis sa propre régulation, est le promoteur P2 du gène *ftsZ*, intervenant lors du processus de septation. Ainsi, les cibles des gènes *whiG* et *whiH* ne sont sans doute par encore toutes connues et le caractère de régulateur global de ces 2 gènes n'a pas encore été mis en évidence. Si tel était le cas, le parallèle avec *rpoS* et *lrp* pourrait être fait et l'avantage adaptatif, s'il existe, apporté par la perte de *whiG* et *whiH* pourrait mieux être compris.

3.5 Hypothèses sur la différence de spectre de mutation observée entre *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*

L'observation de mutants fréquemment mutés dans le gène *whiG* chez *S. ambofaciens* et fréquemment mutés dans le gène *whiH* chez *S. coelicolor* soulève la question de la cible de l'instabilité chez ces 2 espèces. Ces 2 gènes pourraient ne pas avoir exactement la même fonction chez ces 2 espèces ou des caractéristiques de séquences pourraient rendre un des gènes plus mutables dans une des espèces que dans l'autre ou subir des pressions de sélection différentes.

Le séquençage du gène *whiG* de *S. ambofaciens* a révélé 90,2 % d'identité avec le gène *whiG* de *S. coelicolor* et 98,4 % d'identité en acides aminés entre les protéines WhiG des 2 espèces (Catakli *et al.*, 2005). Cette protéine est très conservée au sein du genre. En effet, l'alignement des protéines WhiG de différentes espèces de *Streptomyces*, qu'elles soient phylogénétiquement proches, comme *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*, ou très éloignées, comme *S. ambofaciens* et *S. avermitilis*, révèle une forte conservation. WhiG de *S. ambofaciens* présente 95,4 % d'identité

avec la protéine de *S. avermitilis*, 91,4 % avec celle de *S. griseocarnum* et 91 % avec RpoZ de *S. aureofaciens*. Les régions de reconnaissance des boîtes -10 et -35 sont particulièrement bien conservées, avec 100 % d'identité entre *S. ambofaciens*, *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* (Catakli *et al.*, 2005).

La séquence du gène *whiH* de *S. ambofaciens* n'est pas disponible. Nous avons réalisé l'alignement des gènes *whiH* de 3 espèces de *Streptomyces* en utilisant le logiciel BioEdit. Ceci a révélé que le gène *whiH* de *S. coelicolor* présente 81 % d'identité avec celui de *S. aureofaciens* et 85 % avec celui de *S. avermitilis*. Les gènes *whiH* de *S. aureofaciens* et *S. avermitilis* présentent entre eux 81 % d'identité. Au niveau protéique, les identités en acides aminés sont respectivement de 82, 88 et 86 %. Ainsi, le gène *whiH* semble également bien conservé au sein des bactéries du genre *Streptomyces*. Ceci suggère que la fonction de WhiH dans la sporulation chez ces différentes espèces pourrait être conservée.

En ce qui concerne l'environnement génétique des gènes *whiG* et *whiH*, il semble également conservé. Ainsi, ces 2 gènes ne sont pas situés dans la région variable, ni chez *S. ambofaciens* ni chez *S. coelicolor*. Les gènes bordant *whiG* sont retrouvés, dans le même ordre, dans plusieurs espèces de *Streptomyces*. Ainsi, le gène *whiH* se trouve en amont des gènes *rpoD* ou *hrdB*, codant le facteur σ^{70} , chez *S. avermitilis*, *S. coelicolor* et *S. aureofaciens* et en aval d'un gène codant un transporteur ABC chez *S. avermitilis* et *S. coelicolor*. Le gène *whiG* se trouve quant à lui en aval d'un gène codant un régulateur de type TetR chez *S. coelicolor*, *S. avermitilis* et *S. aureofaciens*. Chez *S. coelicolor*, la présence d'un bactériophage putatif en amont de *whiG* a été détectée. Cet événement d'insertion est absent du génome de *S. avermitilis*. Hormis cette différence, les gènes aux alentours génétiques de *whiG* sont conservés et synthéniques entre les espèces de *Streptomyces*. De plus, la région promotrice, notamment au niveau des nucléotides -1 et -45, parmi lesquels se trouve le site de fixation de BldD, l'est également (Chater and Chandra, 2006).

Les différences observées entre *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* au niveau de la mutabilité des gènes *whiG* et *whiH* ne semblent donc pas pouvoir s'expliquer par un contexte génétique très différent, étant donné la forte conservation des régions portant ces 2 gènes. Cependant, cette observation n'exclut pas une influence du contexte génétique global, qui pourrait entraîner une pression de sélection différente chez les 2 espèces ou un mode de régulation différent lors d'une limitation en acides aminés. Les promoteurs en amont de *whiG* et *whiH* pourraient réagir différemment dans les 2 espèces de *Streptomyces* au même signal lors de l'induction de la réponse stringente ou la molécule signal pourrait avoir une affinité différente pour l'un ou l'autre gène dans les 2 espèces.

La mutation la plus fréquemment détectée dans le gène *whiG* des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor*, consiste en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines en 5' de l'ORF. Si cette mutation est séquence-spécifique, c'est-à-dire que la présence de ces 6 cytosines consécutives augmente la probabilité de mutations à cet endroit, par exemple par glissement de la fourche de réplication, une différence interspécifique au niveau de cette séquence pourrait expliquer une plus faible mutabilité dans ce gène chez *S. coelicolor*. Cependant, l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *whiG* de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* ne révèle aucune différence nucléotidique dans cette région de cytosines répétées, montrant que cette hypothèse est peu plausible pour expliquer la différence observée entre les mutants Pig⁻pap des 2 espèces.

La mutation la plus fréquemment observée dans le gène *whiH* des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* consiste en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines en 3' de l'ORF. La séquence du gène *whiH* de *S. ambofaciens* n'étant pas disponible, il n'est pas possible de savoir si une variabilité interspécifique existe dans cette région. Cependant, l'alignement des séquences des gènes *whiH* de *S. coelicolor*, *S. aureofaciens* et *S. avermitilis* révèle que seul *S. coelicolor* présente cette succession de 6 cytosines en 3' de l'ORF. La présence d'une substitution chez *S. aureofaciens* par rapport à la séquence de *S. coelicolor* entraîne l'absence de cette série de cytosines, remplacée par (CCCCGC). De même, 2 différences sont observées chez *S. avermitilis* par rapport à la séquence de *S. coelicolor* et cette espèce présente un motif (CGCCGC). Il est ainsi possible d'envisager que le gène *whiH* de *S. ambofaciens* ne présente pas ce motif qui semble être sujet à la formation de mutations. Si la mutabilité observée est spécifique à une séquence particulière, le gène *whiH* pourrait être plus mutable que celui de *S. ambofaciens*, du fait de la présence de 6 cytosines consécutives dans sa séquence. Mais cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la faible fréquence de mutation dans le gène *whiG* chez *S. coelicolor* par rapport à *S. ambofaciens* alors que la séquence de 6 cytosines est présente dans les 2 espèces. La différence de fréquence de mutation dans les gènes *whiG* et *whiH* observée entre *S. coelicolor* et *S. ambofaciens* pourrait ainsi résulter à la fois de la présence de séquences prédisposant la formation de mutations et d'une sélection phénotypique du caractère papille différente entre les 2 espèces.

4 Relation entre réponse stringente et production de papilles

4.1 Le mutant *relA* ne produit plus de papilles

La réponse stringente étant la réponse physiologique qui se met en place lors d'une limitation en acides aminés, notre démarche a consisté à étudier le phénotype du mutant *relA* M570 de *S. coelicolor* (Chakraburttty and Bibb, 1997). Ce mutant est incapable de produire des papilles même sur milieu limité en acides aminés et la complémentation de la fonction (p)ppGpp synthétase permet de restaurer un phénotype sauvage, dont la production de papilles donnant naissance à des mutants Pig⁻pap de caractéristiques identiques à ceux isolés à partir de la souche sauvage M600. Ces observations démontrent que la réponse stringente est impliquée dans la production de papilles, donc de mutants Pig⁻pap, chez *S. coelicolor*. Plusieurs actions, directes ou indirectes, du (p)ppGpp, premier signal de la réponse stringente, pourraient expliquer le lien existant entre déclenchement de cette réponse cellulaire et augmentation de la mutabilité des gènes *whiG* et *whiH* chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*.

4.2 Mise en place d'un état mutateur

Les mutants Pig⁻pap caractérisés dans ce travail sont souvent mutés dans les gènes *whiG* ou *whiH*. Ces mutants seraient produits suite au déclenchement de la réponse stringente. Ainsi, lorsque la réponse stringente est induite, la mutabilité de ces 2 gènes augmente. La question qui se pose est de savoir si cette augmentation de fréquence de production de mutants est ciblée à quelques gènes seulement, dont *whiG* et *whiH*, ou si elle reflète une augmentation globale du taux de mutation du génome.

4.2.1 Avantage de l'état mutateur dans l'adaptation

Le taux de mutation peut être hétérogène à l'intérieur d'une espèce, selon les clones ou sous-clones considérés. Cette variation est assurée par la mise en place d'états mutateurs, qui peuvent être globaux ou locaux et transitoires ou héréditaires. Les bactéries dans un tel état pourraient être sélectionnées dans certaines conditions environnementales, notamment lorsque le taux de mutation devient lui-même un frein à l'adaptation (Radman *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 1997). En effet, il a été

montré que dans certaines conditions environnementales, par exemple lors de la colonisation d'un nouvel environnement, comme l'intestin d'une souris, des cellules d'*E. coli* présentant un fort taux de mutations, car mutées dans le gène *mutS*, étaient plus compétitives qu'une souche sauvage, dont le faible taux de mutation est un frein à l'adaptation. Cependant, une fois la colonisation achevée ou lors de la recolonisation d'un environnement similaire, les cellules présentant un faible taux de mutation sont alors avantagées (Giraud *et al.*, 2001).

4.2.2 Etat mutateur global

La mise en place d'un état mutateur global, durant lequel la fréquence de mutations de l'ensemble des gènes du génome est augmentée, permet d'augmenter entre autres la fréquence de mutations favorables. Mais cet état s'accompagne d'un fardeau génétique élevé car la probabilité de production de mutations délétères dans des gènes essentiels est également très élevée. En effet, il a été estimé que pour une mutation favorable générée, 10000 mutations délétères sont produites (Taddei *et al.*, 1997). Chez *E. coli*, de nombreuses conditions de stress, dont l'induction de la réponse stringente, conduisent à l'induction de *rpoS* et de son régulon et ainsi à la mise en place d'un état mutateur global. Cette induction se traduit entre autre par l'augmentation de l'activité des polymérases « error-prone » polIV et polV au dépend de polIII et par l'inactivation du système de réparation post-réplivative de l'ADN (Foster, 2005; Tsui *et al.*, 1997). Chez *Streptomyces*, les études sur la réponse stringente se sont principalement portées sur son influence sur la différenciation physiologique et aucune étude, à ce jour, ne s'est focalisée sur son impact sur le taux de mutation chez cette espèce bactérienne ainsi que sur les mécanismes moléculaires qui pourraient y être impliqués. Il serait ainsi intéressant de tester si la polymérase polIV de *S. coelicolor* est induite lors de la réponse stringente et si elle pourrait ainsi influencer de façon globale la mutabilité de cette espèce lors de conditions de stress.

4.2.3 Etat mutateur local

Les mutateurs locaux, par rapport aux mutateurs globaux, ont pour avantage de permettre une variabilité rapide de certains gènes uniquement, en s'affranchissant du fardeau génétique engendré par les mutations délétères au niveau des gènes de ménage par exemple (Metzgar and Wills, 2000). Ce type de mutateurs résulte le plus souvent de la présence au sein du génome de caractéristiques de séquences qui prédisposent ces régions à de forts taux de mutation. Une des mutations fréquemment

rencontrées au niveau du gène *whiG* des mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* consiste en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines en 5' du gène. De la même manière, une des mutations fréquemment observées dans le gène *whiH* des mutants Pig⁻pap de *S. coelicolor* consiste en l'insertion d'une cytosine dans une série de 6 cytosines en 3' de cette ORF. Le fait que ces séquences de 6 cytosines sont similaires dans des mutants indépendants mutés dans 2 gènes différents des 2 espèces de *Streptomyces* étudiées laisse penser qu'elles pourraient être plus sujettes, du moins dans certaines circonstances, à la formation de mutations. Si tel est le cas, nous pouvons nous interroger sur le fait qu'aucun mutant Pig⁻pap n'ait été identifié comme muté dans un des autres gènes *whi* intervenant dans les premières étapes du processus de sporulation, ce qui pourrait vraisemblablement conduire également au phénotype Pig⁻pap. L'analyse des séquences nucléotidiques de ces gènes, *via* le site Internet du National Center of Biotechnology Information, a révélé que la quasi-totalité des gènes *whi* précoces et tardifs ne présente pas de séquences de 6 cytosines. C'est le cas des gènes *whiA*, *whiB*, *whiJ*, *whiD*, *whiE* et *sigF*. Seul le gène *whiI* présente ce motif et pourrait ainsi être plus sujet à la formation de mutations. L'isolement et la caractérisation d'un plus grand nombre de mutants Pig⁻pap pourraient permettre d'identifier des mutants mutés dans le gène *whiI*, à moins que la sélection phénotypique exercée sur le caractère papille ne permette pas d'identifier de tels mutants par la technique utilisée.

Afin de déterminer si l'augmentation du taux de mutation est globale ou ciblée chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*, il serait intéressant d'étudier des mutants auxotrophes de ces 2 espèces et d'observer si le taux de réversion vers la prototrophie augmente sur milieu limité en acides aminés par rapport au milieu complet HT. Si tel était le cas, les gènes *whiG* et *whiH* n'apparaîtraient plus comme étant les seuls affectés par des mutations sur milieu limité en acides aminés. Cependant, des expériences antérieures avaient montré que des souches mutatrices de *S. ambofaciens* présentant un grand nombre de papilles par colonie donnaient naissance à des colonies auxotrophes à une fréquence inférieure à 10^{-2} , suggérant que le phénotype mutateur n'était pas global mais que seule la pigmentation était affectée (Martin *et al.*, 1998).

La copie additionnelle du gène *whiG* introduite dans les mutants Pig⁻pap de *S. ambofaciens* semble constituer également une cible mutationnelle, puisque de telles colonies présentent des papilles mutées dans le transgène ou ayant perdu la construction introduite. La perte du plasmide introduit est beaucoup plus fréquente dans les mutants Pig⁻pap (75 %) que ce qui est observé dans un contexte sauvage (0,01 %). Le séquençage d'autres gènes présents dans le plasmide pSET152 utilisé comme vecteur pourrait permettre de révéler la présence de mutation en dehors du gène étudié et de mettre en évidence une mutabilité non ciblée.

4.2.4 Réponse stringente et mise en place d'un état mutateur

Compte tenu de l'implication de la réponse stringente dans la production de papilles, donc de mutants mutés dans les gènes *whiG* et *whiH*, il est possible d'envisager que les papilles résultent de la mise en place d'un état mutateur localisé : les gènes sous le contrôle positif du (p)ppGpp seraient plus fortement transcrits et, étant donné la vulnérabilité du brin codant sous forme simple brin aux réactions d'hydrolyse, seraient plus sujets à la formation de mutations. Les gènes *whiG* et *whiH* pourraient faire partie de ces gènes. L'état mutateur n'affecterait ainsi que les gènes du régulon *relA* sous le contrôle positif du (p)ppGpp.

4.2.4.1 *Etat mutateur transitoire*

L'avantage de la mise en place d'un état mutateur transitoire est de présenter de façon temporaire un fort taux d'apparition de mutations conférant une forte valeur adaptative, tout en permettant le retour à un taux de mutation plus faible, donc à un fardeau génétique plus faible pour la population, lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables à une croissance exponentielle ou que le processus adaptatif est achevé (Arjan *et al.*, 1999). Il a maintenant clairement été établi qu'au moins une partie des mutations s'accumulant au niveau de certains gènes, dont celles conférant un avantage adaptatif immédiat, sont le résultat de la mise en place d'états mutateurs transitoires dans une partie de la population (Rosche and Foster, 1999). Le déclenchement de la réponse stringente pourrait être à l'origine de la mise en place d'un état mutateur transitoire, qui pourrait se traduire, d'un point de vue phénotypique, par l'apparition de papilles mutantes à la surface des colonies de *Streptomyces*, avant de revenir à un taux de mutation faible lorsque l'environnement redevient favorable à une croissance exponentielle.

4.2.4.2 *Etat mutateur héréditaire*

La mise en place d'un état mutateur héréditaire à expression constitutive aboutit à une augmentation du taux de mutation dans une cellule et dans sa descendance. Une mutation dans le gène *relA*, lui conférant un niveau d'expression plus fort que dans une souche sauvage, pourrait conduire à l'établissement d'un phénotype mutateur héréditaire et à l'apparition d'un plus grand nombre de papilles sur les colonies. Cependant, le fait que la viabilité des colonies de *Streptomyces* soit affectée lorsque le (p)ppGpp est produit dans les premières 48 heures de croissance sous-entend

que la concentration de protéine RelA doit être suffisamment faible pour ne pas inhiber la croissance (Sun *et al.*, 2001). Cet état mutateur pourrait donc être héréditaire mais, contrairement à une expression constitutive, cette mutation aurait comme conséquence une expression plus forte de RelA uniquement à certains moments du développement.

4.2.5 Conclusion

Ainsi, l'observation d'un plus grand nombre de papilles sur les colonies cultivées sur milieu limité en acides aminés que sur celles cultivées sur milieu HT complet peut être expliquée de 2 façons :

➤ Soit en faisant intervenir une augmentation globale du taux de mutation suite à au déclenchement de la réponse stringente. De nombreux mécanismes moléculaires peuvent être impliqués dans ce phénomène et sont récapitulés sur la figure 54.

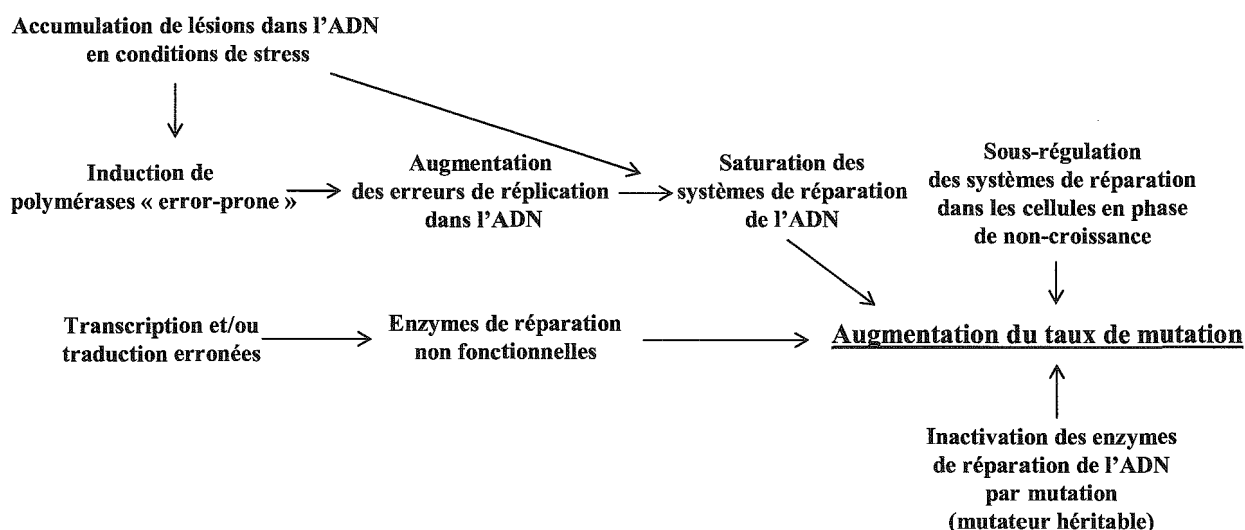


Figure 54 : Mécanismes qui peuvent altérer les systèmes de réparation de l'ADN dans des cellules en condition de stress, par exemple lors de l'induction de la réponse stringente, et augmenter le taux de mutation (d'après Kivisaar *et al.*, 2003).

➤ Soit en faisant intervenir un état mutateur ciblé. La modification du métabolisme en conditions de stress se traduit par une modification de l'expression de nombreux gènes, qui, s'ils sont fortement transcrits, peuvent être plus vulnérables aux mutations. Ces événements pourraient cibler les gènes impliqués dans la cascade de sporulation, et plus particulièrement *whiG* et *whiH*.

Certaines séquences, correspondant à des répétitions de nucléotides, par exemple de cytosines, présentes dans ces 2 gènes, pourraient les rendre plus vulnérables à la formation de mutations.

4.3 Par quels mécanismes la réponse stringente peut-elle être à l'origine des papilles ?

4.3.1 Modification directe du taux d'expression de certains gènes

En réponse à des conditions environnementales défavorables, le (p)ppGpp va rediriger le métabolisme vers des voies différentes de celles observées lors d'une croissance exponentielle, en modifiant positivement ou négativement l'expression de nombreux gènes.

Il a été montré que l'ADN sous forme simple brin était plus sensible aux réactions d'hydrolyse. Or, lors de forts taux de transcription d'un gène, le brin codant demeure longtemps sous forme simple brin et est sujet à des réactions d'hydrolyse qui peuvent aboutir à des mutations (Wright, 1997). Par exemple, le taux de désamination de la cytosine en uracile est 100 fois plus important dans l'ADN sous forme simple brin que lorsqu'il est sous forme double brin (Frederico *et al.*, 1990). De plus, les gènes fortement transcrits sont plus sujets à la réparation que les gènes peu transcrits, ce qui augmente les probabilités d'erreurs par la polymérase (Hanawalt, 1994). La réponse stringente, en modifiant le taux de transcription de certains gènes, pourrait modifier leur taux de mutation (Cashel *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1999). Par exemple, chez *E. coli*, le gène *leuB* est spécifiquement dérégulé lors d'une carence en leucine et son taux de transcription augmente. Les auteurs se sont intéressés à la réversion de l'allèle *leuB⁻*, qui diffère de l'allèle sauvage par une transition d'une cytosine en thymine, ayant pour conséquence le remplacement d'une sérine en leucine. L'augmentation de la transcription de ce gène s'accompagne d'une augmentation du taux de réversion de l'allèle *leuB⁻*, qui est expliqué par l'augmentation de la probabilité que se produise un événement mutationnel, permettant la réversion, sur le brin codant sujet aux mutations (Wright *et al.*, 1999). Ainsi, un lien direct entre augmentation de la transcription et augmentation de la mutabilité a été établi.

Lors d'un stress nutritif, il est possible d'envisager que les colonies de *Streptomyces* déclenchent un signal, par exemple *via* l'induction de la réponse stringente, d'augmentation de la sporulation en réponse à des conditions environnementales défavorables. Le (p)ppGpp pourrait activer directement, en se liant à l'ARN polymérase, ou indirectement, par exemple en réprimant un répresseur ou en stimulant un activateur, la transcription des gènes intervenant dans la cascade de

sporulation. Le (p)ppGpp pourrait affecter le niveau de transcription de différents gènes intervenant dans le processus de sporulation, notamment *whiG*, *whiH* ainsi que leurs régulateurs (Figure 55). La surexpression d'un répresseur ou la sous-expression d'un activateur peut provoquer une non fonctionnalité des gènes *whiG* et *whiH*. Cette hypothèse permet notamment d'expliquer le phénotype des mutants Pig⁻pap de *S. ambifaciens* de la classe B. De même, l'augmentation de la transcription d'un activateur ou d'un répresseur de *whiG* ou *whiH* peut engendrer des mutations dans ces gènes. Par exemple, pour les mutants Pig⁻pap de *S. ambifaciens* de la classe B, une mutation dans le gène codant un anti- σ^{WhiG} pourrait le rendre plus actif et il séquestrerait en continu σ^{WhiG} . Une mutation dans un facteur anti-anti- σ^{WhiG} pourrait l'inactiver et empêcher la levée de la séquestration par l'anti- σ^{WhiG} .

Les gènes *whiG* et *whiH* plus particulièrement pourraient être sensibles au (p)ppGpp et leur taux de transcription augmenté. Cette augmentation de la transcription s'accompagnerait d'une augmentation du taux de mutation au niveau de ces 2 gènes. Il pourrait être intéressant d'étudier l'action du (p)ppGpp sur l'expression des gènes *whiG* et *whiH* et de comparer cette action avec ce qui est observé pour les gènes démontrés comme étant (p)ppGpp-dépendants.

Des analyses transcriptionnelles effectuées sur *whiG* ont cependant montré que son taux de transcription était relativement constant tout au long du cycle de développement de la colonie (Kelemen *et al.*, 1996). Cette observation suggérerait une régulation post-transcriptionnelle de *whiG*, puisque la protéine WhiG n'est active que lors de la mise en place du processus de sporulation alors que le gène *whiG* est transcrit à tous les stades de croissance. Ces expériences n'excluent toutefois par formellement l'hypothèse selon laquelle le gène *whiG* pourrait subir une augmentation de transcription lors du déclenchement de la réponse stringente. En effet, les analyses de Kelemen *et al.* (1996) ont été réalisées à des points précis du développement, c'est-à-dire à 24, 36, 48, 72 et 96 heures de croissance. Elliot *et al.* (2001) ont cependant détecté une augmentation d'un facteur 2 environ du taux de transcrit de *whiG* au point correspondant à 48 heures de culture (Elliot *et al.*, 2001). Ce temps pourrait correspondre à une baisse de la quantité de nutriments disponibles dans le milieu. Il serait intéressant de tester, par des expériences de RT-PCR quantitative, le taux de transcription de *whiG* dans un contexte *relA*⁺ et *relA*⁻ lors de l'induction de la réponse stringente. Ainsi, le taux de transcription de ce gène chez le mutant M570 et chez la souche M570_{pIJ6084}[1] après induction au thiostrepton pourrait être comparé par RT-PCR quantitative.

Quant au gène *whiH*, des analyses transcriptionnelles ont montré qu'il était temporellement régulé, *via* WhiG, et transcrit activement à partir de 48h de croissance (Ryding *et al.*, 1998). Ces expériences n'excluent pas non plus que la réponse stringente puisse induire la transcription de ce gène. L'extraction des ARN totaux du mutant M570 et de son complémentant induit au thiostrepton pourrait être réalisée ainsi que la transcription inverse de ces ARN en ADNc et la mesure par PCR

quantitative de la quantité d'ADNc spécifiques à *whiH*. La détection d'une augmentation consécutive de la transcription, que ce soit pour le gène *whiG* ou le gène *whiH*, pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la mutabilité ciblée au niveau de ces gènes.

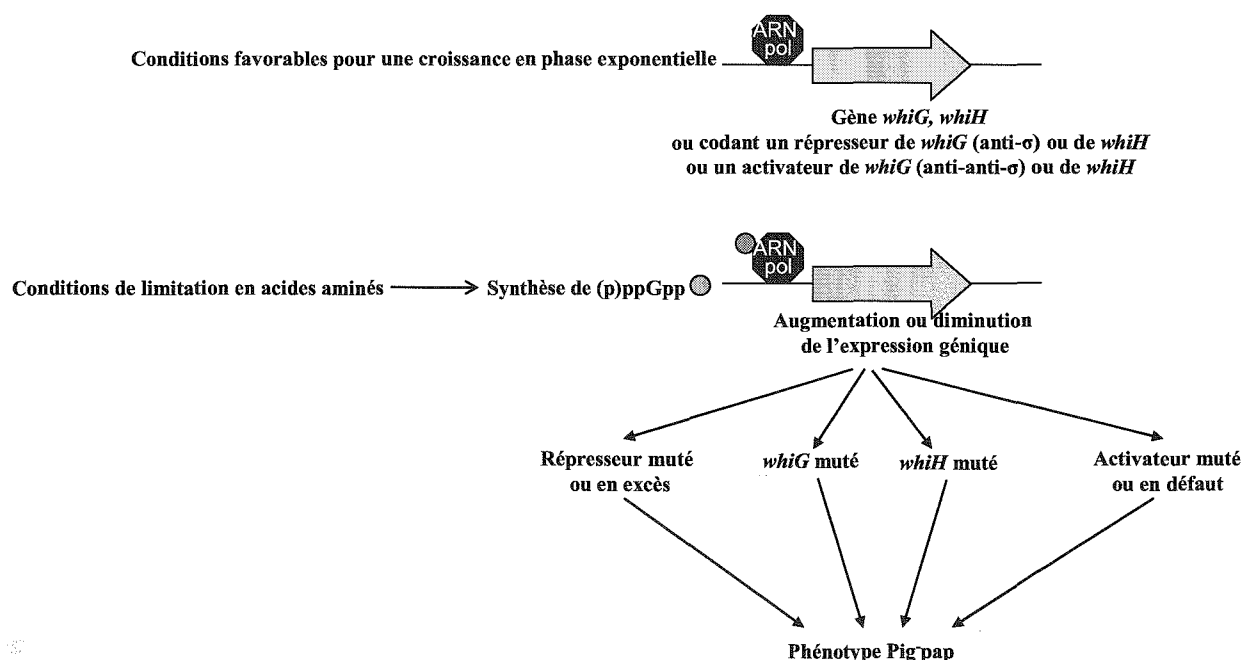


Figure 55 : Représentation schématique de l'influence que le (p)ppGpp pourrait avoir sur les taux de transcription et de mutation des gènes *whiG* et *whiH* et de gènes intervenant dans l'activation ou la répression de ces 2 gènes.

Dans tous les cas, l'introduction d'une copie supplémentaire du gène *whiG* peut compléter le phénotype mutant, soit directement dans le cas des mutants de la classe A, soit par effet dose, dans le cas des mutants de la classe B, par exemple si un répresseur est en excès ou muté et plus actif, la seconde copie du gène *whiG* pouvant permettre de produire suffisamment de σ^{WhiG} pour activer la suite de la cascade de sporulation, même en présence de fortes quantités de répresseur. L'intégration du plasmide pSET152(*whiG*) au niveau du site *attB* du phage Φ C31 pourrait permettre de s'affranchir d'un activateur en défaut ou muté et moins actif car la nouvelle copie de *whiG* n'est plus dans le même contexte génétique.

4.3.2 Modification d'expression par induction de facteurs σ -alternatifs

Chez *E. coli*, le (p)ppGpp est requis pour l'activation du facteur σ^S , ainsi que de son régulon, et du facteur σ^{54} lors de l'entrée en phase stationnaire ainsi que de σ^E , qui répond aux stress

extracytoplasmiques (Costanzo and Ades, 2006). Ceci suggère que la réponse stringente, *via* le (p)ppGpp, est un mécanisme clé par lequel les facteurs σ -alternatifs peuvent être activés et produire une réponse adaptée et coordonnée à un stress nutritif.

Chez *B. subtilis*, Zhang et Hadelwang ont montré que le gène *relA* intervenait dans l'induction de σ^B , facteur général de la réponse au stress chez cette espèce (Zhang and Haldenwang, 2003). Chez *S. coelicolor*, il existe un facteur σ^B homologue fonctionnel de σ^S d'*E. coli*. Ce facteur intervient dans la réponse au stress oxydant, thermique et dans le processus de différenciation et contrôle l'expression de plus de 280 gènes, dont plusieurs facteurs σ -alternatifs et facteurs anti- σ (Lee *et al.*, 2005). Il est donc possible d'envisager que la réponse stringente induise l'expression de σ^B chez *S. coelicolor*, comme observé chez *E. coli* et *B. subtilis*, et provoque la modification de nombreuses voies métaboliques *via* l'activation de facteurs σ -alternatifs. En effet, le génome de *S. coelicolor* contient de nombreux gènes codant pour des facteurs σ , dont des facteurs σ -alternatifs, à l'origine d'une régulation fine et complexe du métabolisme. Le facteur σ^B pourrait par exemple activer la cascade de sporulation en induisant *whiG* et provoquer une augmentation de la transcription des gènes intervenant dans ce processus cellulaire. Ces gènes, dont *whiG* et *whiH*, deviendraient donc plus sujets aux mutations en étant plus longtemps sous forme simple brin lors du processus de transcription.

4.3.3 Modification d'expression par augmentation de la compétitivité des facteurs σ -alternatifs

Chez *S. coelicolor*, *WhiH* est régulé par σ^{WhiG} , qui est un facteur σ -alternatif. Or, il a été montré que le (p)ppGpp modifiait la compétitivité des facteurs σ -alternatifs au détriment de σ^{70} (Jishage *et al.*, 2002). En se fixant sur l'ARN polymérase, le (p)ppGpp pourrait modifier l'affinité de σ^{WhiG} pour la liaison au « core » de l'enzyme et diriger la transcription vers les gènes σ^{WhiG} -dépendants dont fait partie *whiH* (Figure 56). Ceci pourrait constituer une explication de l'augmentation de la mutabilité de ce gène chez *S. coelicolor*, *via* l'augmentation de son taux de transcription, par modification de la compétitivité de σ^{WhiG} par rapport à σ^{70} .

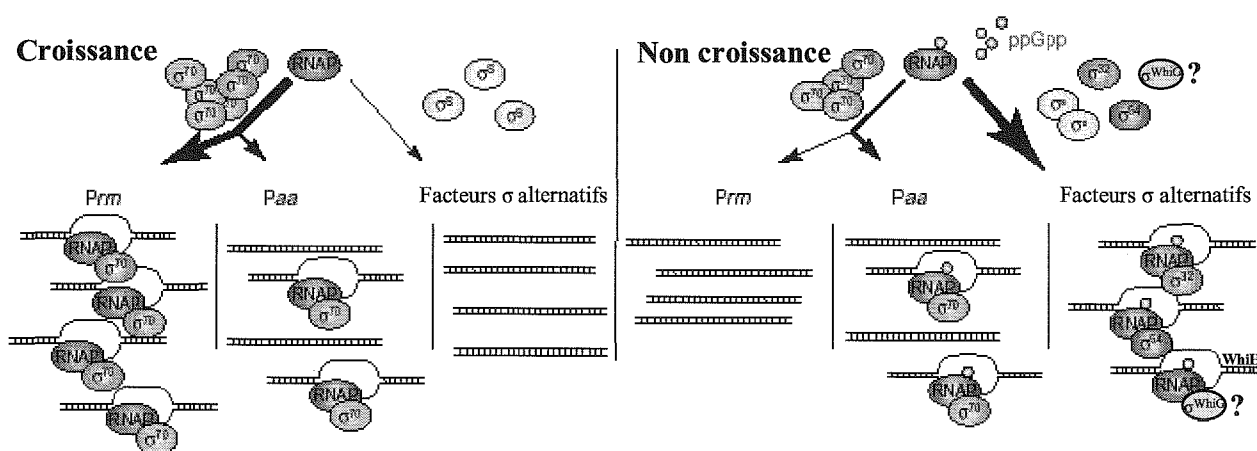


Figure 56 : Modèle de l'implication du (p)ppGpp dans la modification de la compétitivité des facteurs σ pour la fixation à l'ARN polymérase (d'après Magnusson *et al.*, 2005). En phase de croissance, le facteur sigma majoritairement utilisé est σ^{70} , qui dirige principalement la transcription vers les promoteurs *Prm*. En phase de non croissance, le taux d'ARN polymérase liée à σ^{70} baisse en conséquence de l'augmentation de la compétitivité des facteurs σ -alternatifs (σ^S , σ^{32} , σ^{54} et peut-être σ^{whiG} (?)) initiée par le (p)ppGpp. Les gènes dont la transcription dépend de facteurs sigma-alternatifs sont alors plus transcrits, ce qui pourrait être le cas pour *whiH* (?).

En ce qui concerne *S. ambofaciens*, dont le gène *whiG* est l'unique cible mutationnelle détectée chez les mutants *Pig⁻pap* analysés, il est possible au contraire d'imaginer que l'interaction du (p)ppGpp avec l'ARN polymérase empêche la formation de l'holoenzyme ARN polymérase- σ^{whiG} et donc la transcription du gène *whiH* et la poursuite de la cascade de sporulation. Cette hypothèse permettrait d'expliquer ce qui se passe chez les mutants *Pig⁻pap* de la classe B mais pas la présence de mutations dans ce gène chez les mutants de la classe A. Ainsi, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer l'héritabilité du phénotype mutant puisque ne fait intervenir aucun événement mutationnel. Il est plus aisé de considérer que, au moins chez *S. ambofaciens*, le (p)ppGpp n'agisse pas sur la production de papilles par modification de la compétitivité des facteurs σ mais par d'autres actions, telles qu'une modification directe du taux de transcription du gène *whiG*.

4.4 Comparaison moléculaire et physiologique de la réponse stringente chez différents *Streptomyces*

L'étude dans ce travail d'un grand nombre de mutants *Pig⁻pap* issus des 2 espèces de *Streptomyces* étudiées a révélé qu'il existait 2 types de mutants *Pig⁻pap* différant par leur nature

moléculaire chez *S. ambofaciens* et 2 types chez *S. coelicolor*. Il a été montré que le milieu de culture n'influait pas la production de l'un ou l'autre type de mutants en particulier chez les 2 espèces. Cependant, la nature moléculaire de ces mutants est différente entre espèces. Ainsi, les mutants Pig⁻ pap de *S. ambofaciens* étaient soit mutés dans *whiG* soit pouvaient présenter une protéine WhiG inactive peut-être suite à une modification post-transcriptionnelle, alors que les mutants Pig⁻ pap de *S. coelicolor* analysés dans ce travail présentaient une mutation dans le gène *whiH* ou dans le gène *whiG*. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence interspécifique. La première repose sur un mécanisme moléculaire à l'origine de la production de papilles similaire entre les 2 espèces, mais des cibles différentes. La seconde consiste à considérer que le mécanisme moléculaire responsable de la production de papilles est différent entre les 2 espèces de *Streptomyces*. Autrement dit, cela revient à se demander si la réponse stringente pourrait ne pas être directement impliquée dans la production de papilles chez *S. ambofaciens*, comme elle l'est chez *S. coelicolor*. Le séquençage d'un fragment interne du gène *relA* de *S. ambofaciens* a révélé 97 % d'identité en nucléotides avec celui de *S. coelicolor*. Cependant, le séquençage des régions promotrice et terminatrice à l'aide d'oligonucléotides complémentaires des gènes en amont et en aval du gène *relA* chez *S. coelicolor* n'a pu être réalisée faute d'obtention de produits d'amplification, pouvant suggérer une non conservation de ces régions ou de l'environnement génétique de ce gène chez *S. ambofaciens*.

Les études ayant porté sur la réponse stringente chez *Streptomyces* ont mis en évidence que le (p)ppGpp jouait un rôle important dans la différenciation et la production de métabolites secondaires. Ainsi, chez de nombreuses espèces de *Streptomyces*, un mutant incapable de déclencher la réponse stringente n'est plus capable de produire des antibiotiques. Le (p)ppGpp est ainsi requis pour la synthèse d'actinomycine chez *S. antibioticus* (Hoyt and Jones, 1999), de formycine (Ochi, 1986), d'actinorhodine et d'undécylprodigiosine chez *S. coelicolor* (Chakraborty and Bibb, 1997) et de céphamycine C chez *S. clavuligerus* (Jin *et al.*, 2004). Chez toutes ces espèces, il existe donc un lien entre réponse stringente et production d'antibiotiques. La synthèse de métabolites secondaires coïncide avec le début du développement du mycélium aérien, qui correspond à un moment où les nutriments commencent à manquer dans le milieu. La réponse stringente serait donc induite lors du passage du mycélium végétatif au mycélium aérien et déclencherait la synthèse d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires. Outre la différenciation physiologique, le (p)ppGpp influence également la morphologie des colonies. Ainsi, un mutant *relA* de *S. clavuligerus* présente une apparence « bald » (Jin *et al.*, 2004). Sur certains milieux, les colonies d'un mutant *relA* de *S. coelicolor* sont plus petites que celles de la souche sauvage et la croissance est retardée (Chakraborty and Bibb, 1997).

Ainsi, un des points communs de la réponse stringente chez les *Streptomyces* est son implication dans la différenciation morphologique et physiologique.

Au niveau moléculaire, le gène *relA* est conservé au sein des différentes espèces de *Streptomyces*. Ainsi, la réalisation d'un alignement des séquences nucléotidiques du gène *relA* de plusieurs espèces de *Streptomyces* grâce au logiciel BioEdit révèle une identité en nucléotides de 82 à 99 % suivant les espèces. Le gène *relA* de *S. coelicolor* présente 90 % d'identité avec celui de *S. avermitilis*, espèce pourtant très éloignée phylogénétiquement de *S. coelicolor*, 86 % avec celui de *S. clavuligerus*, 89 % avec celui de *S. antibioticus* et 99 % avec celui de *S. lividans*. Le gène *relA* de *S. avermitilis* présente 86 % d'identité avec celui de *S. clavuligerus*, 88 % avec celui de *S. antibioticus* et 93 % avec celui de *S. lividans*. Enfin, le gène *relA* de *S. clavuligerus* présente 82 % d'identité avec celui de *S. antibioticus*, 89 % avec celui de *S. lividans* et les gènes *relA* de *S. antibioticus* et *S. lividans* présentent 95 % d'identité entre eux. Cette identité est présente tout au long de la séquence de l'ORF avec cependant une conservation un peu plus faible dans les 300 premiers nucléotides. Au niveau protéique, RelA de *S. coelicolor* présente respectivement 92, 88, 90 et 100 % d'identité avec la protéine RelA de *S. avermitilis*, *S. clavuligerus*, *S. antibioticus* et *S. lividans*. Celle de *S. avermitilis* présente respectivement 89, 90 et 95 % d'identité avec la protéine RelA de *S. clavuligerus*, *S. antibioticus* et *S. lividans*. Enfin, la protéine RelA de *S. antibioticus* présente respectivement 85 et 95 % d'identité avec celle de *S. antibioticus* et *S. lividans* et les protéines RelA de *S. antibioticus* et *S. lividans* sont identiques à 95 %. L'identité est présente tout au long de la protéine, excepté au niveau des 100 premiers acides aminés.

L'environnement génétique du gène *relA* semble également très conservé au sein de ces espèces. Par exemple, le gène *apt* présent en amont du gène *relA* chez *S. coelicolor* l'est également au moins chez *S. avermitilis* et *S. clavuligerus*. De même, en aval de *relA* chez *S. coelicolor*, se trouve un gène nommé *orf3* codant une protéine de fonction inconnue. Un gène codant une protéine de fonction inconnue présentant 76 % d'identité en acides aminés avec ORF3 est retrouvé par exemple chez *S. avermitilis*. Ainsi, le gène *relA* et son environnement génétique semblent conservés au sein de plusieurs espèces de *Streptomyces*. Le génome de *S. ambofaciens* n'ayant pas été séquencé, du moins au niveau de la région comportant le gène *relA*, aucune information n'est disponible sur son environnement. Il semble peu plausible que l'absence de produit d'amplification lors des expériences de PCR visant à amplifier les régions promotrice et terminatrice de ce gène chez cette espèce puisse être expliquée par la présence d'un environnement génétique différent, mais plutôt à une trop grande divergence entre les séquences de *S. coelicolor*, à partir desquelles ont été choisis les oligonucléotides utilisés, et celles de *S. ambofaciens*. L'alignement des gènes *apt* de *S. coelicolor*, *S. avermitilis* et *S. clavuligerus* révèle une identité en nucléotides de 81 à 87 %. Cette

divergence n'est pas très importante mais peut suffire à inhiber la réaction de PCR si les oligonucléotides correspondent à une région moins bien conservée. Cette hypothèse est également valable pour l'oligonucléotide dessiné dans le gène *orf3*.

Compte tenu de la forte conservation du gène *relA*, de son environnement et de son implication dans la différenciation morphologique et physiologique dans différentes espèces de *Streptomyces*, il est peu probable que la différence de nature moléculaire des mutants Pig⁻ pap de *S. coelicolor* et *S. ambofaciens* soit due à une implication de la réponse stringente dans un cas mais pas dans l'autre. L'hypothèse à privilégier semble donc se situer au niveau des cibles du (p)ppGpp et, de façon plus large, de la réponse stringente. Il est possible d'imaginer que des différences de régulation très fine au niveau des voies régulées par la réponse stringente puissent expliquer la différence observée. Une autre hypothèse est de considérer que la sélection phénotypique exercée sur le caractère papille soit à la base de cette différence interspécifique. Une dissemblance phénotypique pourrait amener à isoler des papilles mutées dans le gène *whiG* chez *S. ambofaciens* et mutées dans le gène *whiH* chez *S. coelicolor* sans que le mécanisme et les cibles sous-jacents soient différents entre les 2 espèces.

Dans ce travail, nous avons donc mis en évidence un lien entre réponse stringente et augmentation du taux de mutation, que ce soit pour le gène *whiH* chez *S. coelicolor* ou le gène *whiG* chez *S. ambofaciens*, à certains stades du développement d'une colonie. Ce type de lien n'avait pas encore été établi chez *Streptomyces* et est encore relativement peu connu dans le monde bactérien.

4.5 Réponse stringente et hérédabilité du phénotype mutateur : un modèle épigénétique ?

Ce travail met en évidence l'existence d'un lien entre composition du milieu de culture et augmentation de la production de papilles. Des travaux antérieurs avaient permis d'isoler des souches de *S. ambofaciens* produisant un très grand nombre de papilles. Ces souches avaient été qualifiées de mutatrices car elles donnaient naissance dans leur descendance, d'une part, à un nombre important de colonies présentant un grand nombre de papilles et d'autre part, à des colonies Pig⁻ col à des fréquences supérieures à une souche sauvage (Martin *et al.*, 1998). Une hypothèse permettant d'expliquer ces observations consiste à envisager une mutation dans le gène *relA*. Si cette mutation conduit à une surexpression de ce gène dans certaines colonies et à certains moments

du développement, il est envisageable que ces dernières produisent un nombre plus important de papilles qu'une souche sauvage, car activent plus fortement la réponse stringente, et que dans leur descendance soient retrouvées des colonies à grand nombre de papilles, puisqu'elles aussi mutées dans le gène *relA*.

Une hypothèse alternative à ce modèle de modification génétique héréditaire au sens strict du terme peut cependant être avancée. Cette hypothèse repose sur des travaux antérieurs ayant mis en évidence l'existence de différents états mutateurs, d'intensité variable, au sens d'une population de *Streptomyces*. En effet, il a été observé que des colonies à grand nombre de papilles donnaient dans leur descendance majoritairement des colonies à grand nombre de papilles, alors que des colonies à faible nombre de papilles donnaient naissance principalement à des colonies à faible nombre de papilles (Figure 57) (Martin *et al.*, 1998).

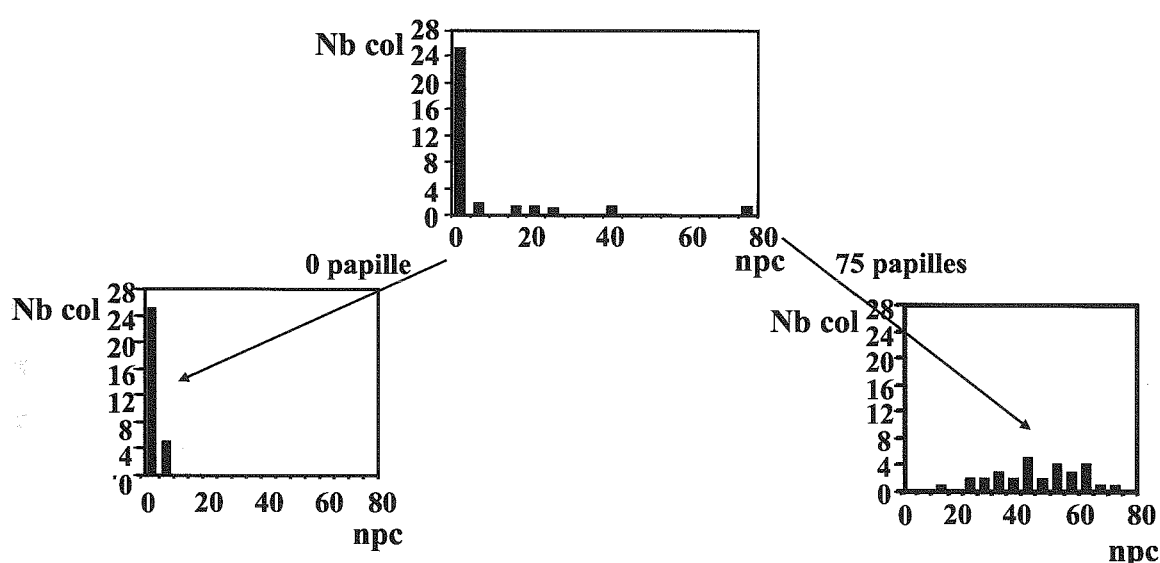


Figure 57 : Distributions du nombre de papilles par colonie (npc) obtenues après croissance de la souche WT4 de *S. ambofaciens* pendant 14 jours à 30°C sur milieu HT. Le nombre de papilles par colonie a été regroupé par classe de 5. Pour chaque distribution, le nombre de colonies observées pour chaque classe est indiqué en ordonnée (Nb col). Lorsqu'une colonie à faible nombre de papilles (ici 0 papille) est repiquée, elle donne naissance à des colonies à faible nombre de papilles (<10 papilles). Lorsqu'une colonie à grand nombre de papilles (ici 75 papilles) est repiquée, elle donne naissance à des colonies à grand nombre de papilles (10 à 75 papilles) (d'après Martin *et al.*, 1998).

Cette observation met donc en évidence une hérédabilité du phénotype mutateur et suggère l'intervention de mécanismes de contrôle très fin de l'état mutateur. Plutôt que d'envisager qu'une mutation soit responsable de ce phénomène, il est possible d'envisager l'intervention d'une modification de type épigénétique, aboutissant à des variations très fines du taux d'expression de certains gènes. Des exemples de telles modifications épigénétiques ont déjà été mis en évidence. En

effet, il a été observé des cas de transmission d'un phénotype, sans présence d'une mutation, acquis lors de conditions particulières de croissance, plusieurs générations après la levée de ces conditions particulières (Guespin-Michel, 2001). Chez *E. coli*, des études ont été menées sur la production de β -galactosidase : des cellules d'une même souche ont été cultivées en parallèle sur milieu lactose (inducteur) ou glucose (pas de production de β -galactosidase). Ces cellules ont ensuite été transférées sur milieu contenant de très faibles concentrations d'inducteur. Alors que les cellules préalablement induites continuaient à produire la β -galactosidase, les cellules n'ayant jamais été cultivées en présence d'inducteur ne le faisaient pas. Après 150 générations de cultures sur un tel milieu, le phénotype des cellules induites était toujours stable. L'explication de ce phénotype fait intervenir une modification épigénétique : lors de la première induction des cellules au lactose, une perméase au lactose a été produite et placée dans la membrane cellulaire (Figure 58). Une fois présente, cette perméase est capable de laisser pénétrer dans le cytoplasme suffisamment de lactose pour inhiber le répresseur de l'opéron *lac* et induire sa propre transcription et l'expression de la β -galactosidase, ce qui n'est pas le cas chez les cellules non induites qui ne présentent pas de perméase au niveau de leur membrane. C'est un phénomène d'auto-régulation positive impliquant une modification épigénétique puisqu'aucune modification de l'information génétique entre les 2 populations (induite et non induite) n'existe.

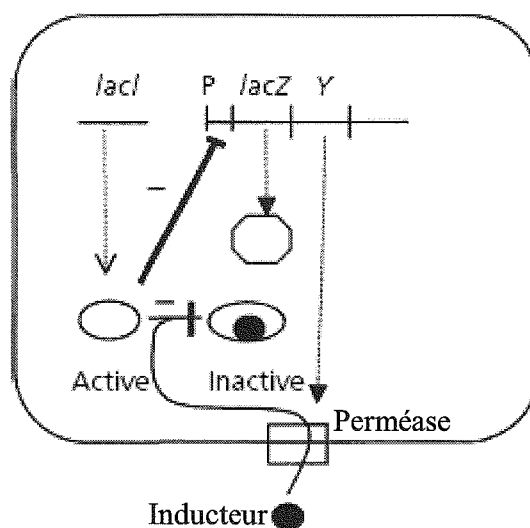


Figure 58 : Représentation de l'opéron *lacZY* montrant le rôle de la perméase dans l'amplification de sa propre synthèse sous de faibles concentrations en inducteurs.

En présence de lactose, celui-ci diffuse dans la cellule et inactive le répresseur LacI de l'opéron *lacZY*, codant la synthèse de la β -galactosidase et de la perméase. Quand le lactose est présent en très faible concentration dans le milieu, il ne peut diffuser dans la cellule à un niveau suffisant pour inactiver LacI sauf si la perméase est déjà présente dans la membrane. Dans ce dernier cas, il y a transcription de l'opéron *lacZY* (d'après Guespin-Michel, 2001).

Une telle situation pourrait être envisagée pour expliquer l'héritabilité du phénotype « grand nombre de papilles » et donc de l'état mutateur : les colonies pourraient avoir été confrontées à une situation ayant déclenché la réponse stringente, puis par un phénomène d'auto-induction, même en absence de limitation en acides aminés, un taux de (p)ppGpp ou d'un facteur intermédiaire intervenant dans la production de papilles, pourrait être produit de façon plus importante que chez des souches n'ayant jamais rencontré de limitation en acides aminés et induire la réponse stringente. Le caractère mutateur serait donc héritable malgré l'absence de mutation dans le génome.

Références bibliographiques

- Ainsa, J.A., Parry, H.D., and 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.
- Ainsa, J.A., Ryding, N.J., Hartley, N., Findlay, K.C., Bruton, C.J., and Chater, K.F. (2000) WhiA, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 5470-5478.
- Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996) An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6059-6063.
- Arjan, J.A., Visser, M., Zeyl, C.W., Gerrish, P.J., Blanchard, J.L., and Lenski, R.E. (1999) Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science* **283**: 404-406.
- Arnosti, D.N., and 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.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**: 3-9.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassilyev, D.G. (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* **117**: 299-310.
- Autret, S., Levine, A., Vannier, F., Fujita, Y., and 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.
- Balzer, G.J., and McLean, R.J. (2002) The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Can J Microbiol* **48**: 675-680.
- Banach-Orlowska, M., Fijalkowska, I.J., Schaaper, R.M., and Jonczyk, P. (2005) DNA polymerase II as a fidelity factor in chromosomal DNA synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **58**: 61-70.
- Bao, K., and Cohen, S.N. (2004) Reverse transcriptase activity innate to DNA polymerase I and DNA topoisomerase I proteins of *Streptomyces* telomere complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14361-14366.
- Barker, M.M., Gaal, T., and Gourse, R.L. (2001a) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J Mol Biol* **305**: 689-702.
- Barker, M.M., Gaal, T., Josaitis, C.A., and Gourse, R.L. (2001b) 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.

- Becker, G., and Hengge-Aronis, R. (2001) What makes an *Escherichia coli* promoter sigma(S) dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of sigma(S). *Mol Microbiol* **39**: 1153-1165.
- Beletskii, A., and Bhagwat, A.S. (1996) Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13919-13924.
- 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., and Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- 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., Molle, V., and Buttner, M.J. (2000) sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 4606-4616.
- Bichara, M., Pinet, I., Origas, M., and Fuchs, R.P. (2006) Inactivation of *recG* stimulates the RecF pathway during lesion-induced recombination in *E. coli*. *DNA Repair (Amst)* **5**: 129-137.
- Bignell, D.R., Warawa, J.L., Strap, J.L., Chater, K.F., and Leskiw, B.K. (2000) Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology* **146** (Pt 9): 2161-2173.
- Birch, A., Hausler, A., and Hutter, R. (1990) Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **172**: 4138-4142.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., and Matic, I. (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**: 1404-1409.
- Bjelland, S., Bjoras, M., and Seeberg, E. (1993) Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **21**: 2045-2049.
- Borodina, I., Krabben, P., and Nielsen, J. (2005) Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res* **15**: 820-829.
- Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2006) New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol* **14**: 45-54.
- Brown, L., Gentry, D., Elliott, T., and Cashel, M. (2002) DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J Bacteriol* **184**: 4455-4465.

- Bruck, I., Goodman, M.F., and O'Donnell, M. (2003) The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem* **278**: 44361-44368.
- Cairns, J., Overbaugh, J., and Miller, S. (1988) The origin of mutants. *Nature* **335**: 142-145.
- Cairns, J., and Foster, P.L. (1991) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**: 695-701.
- Calmann, M.A., Evans, J.E., and Marinus, M.G. (2005a) MutS inhibits RecA-mediated strand transfer with methylated DNA substrates. *Nucleic Acids Res* **33**: 3591-3597.
- Calmann, M.A., Nowosielska, A., and Marinus, M.G. (2005b) Separation of mutation avoidance and antirecombination functions in an *Escherichia coli mutS* mutant. *Nucleic Acids Res* **33**: 1193-1200.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., and Vinella, D. (1996) The Stringent Response. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology*. Vol. 2nd edition. Niedhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds). Washington D. C.: ASM Press, pp. 1458-1496.
- Catakli, S. (2004) Action de facteurs génétiques et environnementaux sur la dynamique mutationnelle au cours de la différenciation chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. In *Laboratoire de Génétique et Microbiologie* Nancy: Henri Poincaré.
- Catakli, S., Andrieux, A., Decaris, B., and Dary, A. (2005) Sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of a mutational phenomenon occurring during aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *Res Microbiol* **156**: 328-340.
- Chakraborty, R., and 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.
- Chat, L.L., Fons, M., and Taddei, F. (2006) *Escherichia coli* mutators: selection criteria and migration effect. *Microbiology* **152**: 67-73.
- 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., and Chandra, G. (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 651-672.
- Chatterji, D., and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**: 160-165.
- Chen, C.W. (1996) Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet* **12**: 192-196.

- Costanzo, A., and Ades, S.E. (2006) Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J Bacteriol* **188**: 4627-4634.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., and Hanawalt, P.C. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**: 41-64.
- Crawford, E.W., Jr., and Shimkets, L.J. (2000) The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Dev* **14**: 483-492.
- Dahl, J.L., Kraus, C.N., Boshoff, H.I., Doan, B., Foley, K., Avarbock, D., Kaplan, G., Mizrahi, V., Rubin, H., and Barry, C.E., 3rd (2003) The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10026-10031.
- Dary, A., Martin, P., Wenner, T., Leblond, P., and Decaris, B. (1999) Evolution of the linear chromosomal DNA in *Streptomyces*: is genomic variability developmentally modulated? *Res Microbiol* **150**: 439-445.
- Dary, A., Martin, P., Wenner, T., Decaris, B., and Leblond, P. (2000) DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control. *Biochimie* **82**: 29-34.
- Davis, N.K., and 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.
- Delmas, S., and Matic, I. (2005) Cellular response to horizontally transferred DNA in *Escherichia coli* is tuned by DNA repair systems. *DNA Repair (Amst)* **4**: 221-229.
- Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Janniere, L., and Ehrlich, S.D. (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science* **294**: 1716-1719.
- Dinglay, S., Trewick, S.C., Lindahl, T., and Sedgwick, B. (2000) Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants. *Genes Dev* **14**: 2097-2105.
- DiRusso, C.C., and Nystrom, T. (1998) The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol Microbiol* **27**: 1-8.
- Dorazi, R. (2003) Can tRNAs act as antisense RNA? The case of *mutA* and *dnaQ*. *J Theor Biol* **225**: 383-388.
- Drake, J.W. (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7160-7164.
- Dworkin, M. (2000) Introduction to the myxobacteria. In *Prokaryotic development*. Brun, Y.V. (ed), pp. 221-242.

- Eichman, B.F., O'Rourke, E.J., Radicella, J.P., and Ellenberger, T. (2003) Crystal structures of 3-methyladenine DNA glycosylase MagIII and the recognition of alkylated bases. *Embo J* **22**: 4898-4909.
- Eisen, J.A. (1998) A phylogenomic study of the MutS family of proteins. *Nucleic Acids Res* **26**: 4291-4300.
- Elliot, M.A., Bibb, M.J., Buttner, M.J., and Leskiw, B.K. (2001) BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **40**: 257-269.
- Erickson, D.L., Lines, J.L., Pesci, E.C., Venturi, V., and Storey, D.G. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* *relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun* **72**: 5638-5645.
- Feng, G., Tsui, H.C., and Winkler, M.E. (1996) Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J Bacteriol* **178**: 2388-2396.
- Ferenci, T. (2001) Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol* **3**: 605-611.
- Ferenci, T. (2003) What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends Microbiol* **11**: 457-461.
- Ferenci, T. (2005) Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Mol Microbiol* **57**: 1-8.
- Fijalkowska, I.J., and Schaaper, R.M. (1995) Effects of *Escherichia coli* *dnaE* antimutator alleles in a proofreading-deficient *mutD5* strain. *J Bacteriol* **177**: 5979-5986.
- Finkel, S.E., and Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4023-4027.
- Finkel, S.E., and Kolter, R. (2001) DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* **183**: 6288-6293.
- Fischer, G., Decaris, B., and 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., Holl, A.C., Volff, J.N., Vandewiele, D., Decaris, B., and Leblond, P. (1998) Replication of the linear chromosomal DNA from the centrally located *oriC* of *Streptomyces ambofaciens* revealed by PFGE gene dosage analysis. *Res Microbiol* **149**: 203-210.
- Flardh, K., Findlay, K.C., and 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.
- Flett, F., de Mello Jungmann-Campello, D., Mersinias, V., Koh, S.L., Godden, R., and Smith, C.P. (1999) A 'gram-negative-type' DNA polymerase III is essential for replication of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **31**: 949-958.

- Foster, K.A., Barnes, M.H., Stephenson, R.O., Butler, M.M., Skow, D.J., LaMarr, W.A., and Brown, N.C. (2003) DNA polymerase III of *Enterococcus faecalis*: expression and characterization of recombinant enzymes encoded by the *polC* and *dnaE* genes. *Protein Expr Purif* **27**: 90-97.
- Foster, P.L. (1997) Nonadaptive mutations occur on the F' episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 1550-1554.
- Foster, P.L. (1999) Are adaptive mutations due to a decline in mismatch repair? The evidence is lacking. *Mutat Res* **436**: 179-184.
- Foster, P.L. (2004) Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 4846-4852.
- Foster, P.L. (2005) Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat Res* **569**: 3-11.
- Frederico, L.A., Kunkel, T.A., and Shaw, B.R. (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* **29**: 2532-2537.
- Fromme, J.C., and Verdine, G.L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J Biol Chem* **278**: 51543-51548.
- Fromme, J.C., Banerjee, A., Huang, S.J., and Verdine, G.L. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* **427**: 652-656.
- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi, J., and Aratani, Y. (1986) Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **261**: 13744-13753.
- Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J., Clendenin, W.M., and Miller, J.H. (2001) Amplification of mutator cells in a population as a result of horizontal transfer. *J Bacteriol* **183**: 3737-3741.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2001) Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**: 939-954.
- Gale, E.F., and Folkes, J.P. (1958) The assimilation of amino acids by bacteria. 26. The incorporation of adenine into the nucleic acid of disrupted staphylococcal cells. *Biochem J* **69**: 620-627.
- Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Nguyen, L.H., Jensen, D.B., and Cashel, M. (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* **175**: 7982-7989.
- Gentry, D.R., and Cashel, M. (1996) Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol Microbiol* **19**: 1373-1384.
- Ghosh, P., Ramakrishnan, C., and Chatterji, D. (2003) Inter-subunit recognition and manifestation of segmental mobility in *Escherichia coli* RNA polymerase: a case study with omega-beta' interaction. *Biophys Chem* **103**: 223-237.

- Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., and Taddei, F. (2001) Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* **291**: 2606-2608.
- Givens, R.M., Lin, M.H., Taylor, D.J., Mechold, U., Berry, J.O., and Hernandez, V.J. (2004) Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* **279**: 7495-7504.
- Godoy, V.G., Jarosz, D.F., Walker, F.L., Simmons, L.A., and Walker, G.C. (2006) Y-family DNA polymerases respond to DNA damage-independent inhibition of replication fork progression. *Embo J* **25**: 868-879.
- Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**: 17-50.
- Guespin-Michel, J. (2001) Epigenesis--a request for information on loss of adaptive phenotypes. *Microbiology* **147**: 252-253.
- Haber, L.T., Pang, P.P., Sobell, D.I., Mankovich, J.A., and Walker, G.C. (1988) Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium mutS* gene required for mismatch repair: homology of MutS and HexA of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **170**: 197-202.
- Hammer, B.K., and Swanson, M.S. (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33**: 721-731.
- Hanawalt, P.C. (1994) Evolution of concepts in DNA repair. *Environ Mol Mutagen* **23 Suppl 24**: 78-85.
- Haralalka, S., Nandi, S., and Bhadra, R.K. (2003) Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects in vitro and in vivo expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**: 4672-4682.
- Harfe, B.D., and Jinks-Robertson, S. (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* **34**: 359-399.
- Harris, B.Z., Kaiser, D., and 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., Feng, G., Ross, K.J., Sidhu, R., Thulin, C., Longerich, S., Szigety, S.K., Hastings, P.J., Winkler, M.E., and Rosenberg, S.M. (1999) Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. *Mutat Res* **437**: 51-60.
- Hastings, P.J., Bull, H.J., Klump, J.R., and Rosenberg, S.M. (2000) Adaptive amplification: an inducible chromosomal instability mechanism. *Cell* **103**: 723-731.
- Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2002) In pursuit of a molecular mechanism for adaptive gene amplification. *DNA Repair (Amst)* **1**: 111-123.
- Haydon, D.J., and Guest, J.R. (1991) A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol Lett* **63**: 291-295.
- Hengge-Aronis, R. (1996) Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 887-893.

- Hengge-Aronis, R. (2002a) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 373-395, table of contents.
- Hengge-Aronis, R. (2002b) Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol* **5**: 591-595.
- Hernandez, V.J., and Bremer, H. (1991) *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J Biol Chem* **266**: 5991-5999.
- Hernandez, V.J., and Cashel, M. (1995) Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J Mol Biol* **252**: 536-549.
- Hersh, M.N., Ponder, R.G., Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2004) Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress. *Res Microbiol* **155**: 352-359.
- Hilbert, D.W., and Piggot, P.J. (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 234-262.
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., and Hilgenfeld, R. (2004) Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell* **117**: 57-68.
- Hollis, T., Ichikawa, Y., and Ellenberger, T. (2000) DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. *Embo J* **19**: 758-766.
- Horst, J.P., Wu, T.H., and Marinus, M.G. (1999) *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol* **7**: 29-36.
- Hoyt, S., and 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.
- Hsu, D.S., Kim, S.T., Sun, Q., and Sancar, A. (1995) Structure and function of the UvrB protein. *J Biol Chem* **270**: 8319-8327.
- Huffman, J.L., Sundheim, O., and Tainer, J.A. (2005) DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* **577**: 55-76.
- Humbert, O., Prudhomme, M., Hakenbeck, R., Dowson, C.G., and Claverys, J.P. (1995) Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9052-9056.
- Hunt, A.C., Servin-Gonzalez, L., Kelemen, G.H., and Buttner, M.J. (2005) The *bldC* developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family. *J Bacteriol* **187**: 716-728.

- Hutchings, M.I., Hoskisson, P.A., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2004) Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **150**: 2795-2806.
- Inoue, R., Kaito, C., Tanabe, M., Kamura, K., Akimitsu, N., and Sekimizu, K. (2001) Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are essential for chromosomal DNA replication in *Staphylococcus aureus*. *Mol Genet Genomics* **266**: 564-571.
- Jain, V., Kumar, M., and Chatterji, D. (2006) ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol* **44**: 1-10.
- Jakimowicz, P., Cheesman, M.R., Bishai, W.R., Chater, K.F., Thomson, A.J., and Buttner, M.J. (2005) Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. *J Biol Chem* **280**: 8309-8315.
- Janion, C. (2001) Some aspects of the SOS response system--a critical survey. *Acta Biochim Pol* **48**: 599-610.
- Jin, W., Ryu, Y.G., Kang, S.G., Kim, S.K., Saito, N., Ochi, K., Lee, S.H., and Lee, K.J. (2004) Two relA/spoT homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **150**: 1485-1493.
- Jiricny, J. (1998) Replication errors: cha(lle)nging the genome. *Embo J* **17**: 6427-6436.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nystrom, T. (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**: 1260-1270.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* **74**: 283-315.
- Kao, Y.T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A., and Zhong, D. (2005) Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16128-16132.
- Kaplan, H.B. (2003) Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 572-577.
- Kelemen, G.H., Brown, G.L., Kormanec, J., Potuckova, L., Chater, K.F., and 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., Brian, P., Flardh, K., Chamberlin, L., Chater, K.F., and Buttner, M.J. (1998) Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **180**: 2515-2521.
- Kelemen, G.H., and Buttner, M.J. (1998) Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 656-662.
- Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* **64**: 171-200.

- Kim, D.W., Chater, K., Lee, K.J., and Hesketh, A. (2005) Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **187**: 2957-2966.
- Kivisaar, M. (2003) Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ Microbiol* **5**: 814-827.
- Klapacz, J., and Bhagwat, A.S. (2002) Transcription-dependent increase in multiple classes of base substitution mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6866-6872.
- Koonin, E.V., and Bork, P. (1996) Ancient duplication of DNA polymerase inferred from analysis of complete bacterial genomes. *Trends Biochem Sci* **21**: 128-129.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., and Rudd, K.E. (1996) Sequencing and analysis of bacterial genomes. *Curr Biol* **6**: 404-416.
- Kormanec, J., Potuckova, L., and Rezuchova, B. (1994) The *Streptomyces aureofaciens* homologue of the *whiG* gene encoding a putative sigma factor essential for sporulation. *Gene* **143**: 101-103.
- Kornberg, A., and Baker, T.A. (1992) *DNA Replication*. New York: W. H. Freeman and company.
- Krohn, M., and Wagner, R. (1996) Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J Biol Chem* **271**: 23884-23894.
- Kvint, K., Farewell, A., and Nystrom, T. (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J Biol Chem* **275**: 14795-14798.
- Labahn, J., Scharer, O.D., Long, A., Ezaz-Nikpay, K., Verdine, G.L., and Ellenberger, T.E. (1996) Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell* **86**: 321-329.
- Lacour, S., Kolb, A., and Landini, P. (2003) Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial sigmaS-RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**: 37160-37168.
- Lacour, S., and Landini, P. (2004) SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol* **186**: 7186-7195.
- Lange, R., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1995) Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 4676-4680.
- Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nystrom, T., and Shingler, V. (2003) The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**: 1494-1503.

- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993) The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* **10**: 923-933.
- Lloyd, R.G., and Buckman, C. (1991) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J Bacteriol* **173**: 1004-1011.
- Magnusson, L.U., Nystrom, T., and Farewell, A. (2003) Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *J Biol Chem* **278**: 968-973.
- Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nystrom, T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- Majewski, J., Zawadzki, P., Pickerill, P., Cohan, F.M., and Dowson, C.G. (2000) Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol* **182**: 1016-1023.
- Markovitz, A. (2005) A new in vivo termination function for DNA polymerase I of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **55**: 1867-1882.
- Martin, P., Dary, A., and 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., and 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.
- Martinez-Costa, O.H., Fernandez-Moreno, M.A., and Malpartida, F. (1998) The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. *J Bacteriol* **180**: 4123-4132.
- Massey, R.C., and Buckling, A. (2002) Environmental regulation of mutation rates at specific sites. *Trends Microbiol* **10**: 580-584.
- Matic, I., Rayssiguier, C., and Radman, M. (1995) Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* **80**: 507-515.
- Matic, I., Taddei, F., and Radman, M. (2004) Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress. *Res Microbiol* **155**: 337-341.
- McCann, J.A., and Berti, P.J. (2003) Adenine release is fast in MutY-catalyzed hydrolysis of G:A and 8-Oxo-G:A DNA mismatches. *J Biol Chem* **278**: 29587-29592.
- McClintock, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **36**: 344-355.
- McGlynn, P., and 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. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol* **49**: 1157-1165.

- McKenzie, G.J., Lee, P.L., Lombardo, M.J., Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2001) SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol Cell* **7**: 571-579.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., and Cashel, M. (2002) Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* **184**: 2878-2888.
- Metzgar, D., and Wills, C. (2000) Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. *Cell* **101**: 581-584.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P., and 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.
- Michaels, M.L., and Miller, J.H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol* **174**: 6321-6325.
- Mika, F., and Hengge, R. (2005) A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev* **19**: 2770-2781.
- Miksch, G., Bettenworth, F., Friehs, K., and Flaschel, E. (2005) The sequence upstream of the -10 consensus sequence modulates the strength and induction time of stationary-phase promoters in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 312-320.
- Molle, V., and 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., and 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, M.H., Gulbis, J.M., Dodson, E.J., Demple, B., and Moody, P.C. (1994) Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O6-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *Embo J* **13**: 1495-1501.
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C., and Hengge-Aronis, R. (1997) Heat shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 445-452.
- Nagata, Y., Mashimo, K., Kawata, M., and Yamamoto, K. (2002) The roles of Klenow processing and flap processing activities of DNA polymerase I in chromosome instability in *Escherichia coli* K12 strains. *Genetics* **160**: 13-23.
- Nickels, B.E., and Hochschild, A. (2004) Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. *Cell* **118**: 281-284.

- Nodwell, J.R., McGovern, K., and Losick, R. (1996) An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **22**: 881-893.
- Nodwell, J.R., Yang, M., Kuo, D., and Losick, R. (1999) Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**: 569-584.
- Nunez, C., Esteve-Nunez, A., Giometti, C., Tollaksen, S., Khare, T., Lin, W., Lovley, D.R., and Methe, B.A. (2006) DNA microarray and proteomic analyses of the RpoS regulon in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* **188**: 2792-2800.
- Nystrom, T. (2004) Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol* **54**: 855-862.
- O'Brien, P.J., and Ellenberger, T. (2004) The *Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase AlkA has a remarkably versatile active site. *J Biol Chem* **279**: 26876-26884.
- Ochi, K., Kandala, J.C., and Freese, E. (1981) Initiation of *Bacillus subtilis* sporulation by the stringent response to partial amino acid deprivation. *J Biol Chem* **256**: 6866-6875.
- Ochi, K. (1986) Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *J Gen Microbiol* **132**: 2621-2631.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and 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., and Horinouchi, S. (2002) Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 1-7.
- Olivera, R.M., and Bonhoeffer, E. (1974) Replication of *Escherichia coli* requires DNA polymerase I. *Nature* **250**: 513-514.
- Oller, A.R., and 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., and 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., and Ikeda, H. (1999) *Escherichia coli* *mutM* suppresses illegitimate recombination induced by oxidative stress. *Genetics* **151**: 439-446.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2766-2770.

- Ouchane, S., Picaud, M., Vernotte, C., and Astier, C. (1997) Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *Embo J* **16**: 4777-4787.
- Park, D.I., Park, S.H., Kim, S.H., Kim, J.W., Cho, Y.K., Kim, H.J., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Cho, E.Y., Kim, E.J., Chae, S.W., Sohn, J.H., Sung, I.K., Sepulveda, A.R., and Kim, J.J. (2005) Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. *Helicobacter* **10**: 179-184.
- Patel, P.H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A., and Loeb, L.A. (2001) Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol* **308**: 823-837.
- Patten, C.L., Kirchhof, M.G., Schertzberg, M.R., Morton, R.A., and Schellhorn, H.E. (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* **272**: 580-591.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., and Gourse, R.L. (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**: 311-322.
- Paul, B.J., Berkmen, M.B., and Gourse, R.L. (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7823-7828.
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., and Vassilyev, D.G. (2004) Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* **118**: 297-309.
- Petkovic, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I.S., Peric-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D., and Long, P.F. (2006) Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 704-728.
- Pham, P.T., Zhao, W., and Schaaper, R.M. (2006) Mutator mutants of *Escherichia coli* carrying a defect in the DNA polymerase III tau subunit. *Mol Microbiol* **59**: 1149-1161.
- Pizarro-Cerda, J., and Tedin, K. (2004) The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**: 1827-1844.
- Platko, J.V., and Calvo, J.M. (1993) Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J Bacteriol* **175**: 1110-1117.
- Potuckova, L., Kelemen, G.H., Findlay, K.C., Lonetto, M.A., Buttner, M.J., and 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.
- Priebe, S.D., Hadi, S.M., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1988) Nucleotide sequence of the *hexA* gene for DNA mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae* and homology of *hexA* to mutS of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**: 190-196.
- Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C.E., 3rd (2000) The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**: 4889-4898.

- Prudhomme, M., Martin, B., Mejean, V., and Claverys, J.P. (1989) Nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* *hexB* mismatch repair gene: homology of HexB to MutL of *Salmonella typhimurium* and to PMS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **171**: 5332-5338.
- Pruteanu, M., and Hengge-Aronis, R. (2002) The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for sigmaS proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in sigmaS turnover in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 1701-1713.
- Radman, M., Taddei, F., and Matic, I. (2000) Evolution-driving genes. *Res Microbiol* **151**: 91-95.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S., and Radman, M. (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**: 396-401.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., and 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.
- Reisner, A., Haagenzen, J.A., Schembri, M.A., Zechner, E.L., and Molin, S. (2003) Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**: 933-946.
- Reuven, N.B., Arad, G., Maor-Shoshani, A., and Livneh, Z. (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem* **274**: 31763-31766.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J. (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* **277**: 12507-12515.
- Rosche, W.A., and 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.
- Rosenberg, S.M. (1994) In pursuit of a molecular mechanism for adaptive mutation. *Genome* **37**: 893-899.
- Rosenzweig, R.F., Sharp, R.R., Treves, D.S., and Adams, J. (1994) Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* **137**: 903-917.
- Roth, V., Aigle, B., Bunet, R., Wenner, T., Fourier, C., Decaris, B., and Leblond, P. (2004) Differential and cross-transcriptional control of duplicated genes encoding alternative sigma factors in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol* **186**: 5355-5365.
- Roth, J.R., and Andersson, D.I. (2004) Amplification-mutagenesis--how growth under selection contributes to the origin of genetic diversity and explains the phenomenon of adaptive mutation. *Res Microbiol* **155**: 342-351.
- Ryding, N.J., Kelemen, G.H., Whatling, C.A., Flardh, K., Buttner, M.J., and 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-Ruf, C., Taddei, F., and Matic, I. (2004) Stress and survival of aging *Escherichia coli rpoS* colonies. *Genetics* **168**: 541-546.
- Saint-Ruf, C., and Matic, I. (2006) Environmental tuning of mutation rates. *Environ Microbiol* **8**: 193-199.
- Saumaa, S., Tover, A., Kasak, L., and Kivisaar, M. (2002) Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS. *J Bacteriol* **184**: 6957-6965.
- Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R., and Kivisaar, M. (2006) Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)* **5**: 505-514.
- Schaaper, R.M., and Dunn, R.L. (1987) Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: the nature of *in vivo* DNA replication errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6220-6224.
- Schofield, M.J., and Hsieh, P. (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57**: 579-608.
- Schultz, J.E., and Martin, A. (1991) Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **218**: 129-140.
- Seeborg, E., Eide, L., and Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* **20**: 391-397.
- Shimokawa, H., Fujii, Y., Furuichi, M., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (2000) Functional significance of conserved residues in the phosphohydrolase module of *Escherichia coli* MutT protein. *Nucleic Acids Res* **28**: 3240-3249.
- Slater, S.C., Lifshits, M.R., O'Donnell, M., and Maurer, R. (1994) *holE*, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a *holE* mutant and comparison with a *dnaQ* (epsilon-subunit) mutant. *J Bacteriol* **176**: 815-821.
- Slatko, B.E., and Hiraizumi, Y. (1975) Elements causing male crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **81**: 313-324.
- Soliveri, J., Brown, K.L., Buttner, M.J., and Chater, K.F. (1992) Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. *J Bacteriol* **174**: 6215-6220.
- Soliveri, J., Vijgenboom, E., Granozzi, C., Plaskitt, K.A., and 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**: 2569-2578.
- Soliveri, J.A., Gomez, J., Bishai, W.R., and Chater, K.F. (2000) Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology* **146** (Pt 2): 333-343.

- Song, M., Kim, H.J., Kim, E.Y., Shin, M., Lee, H.C., Hong, Y., Rhee, J.H., Yoon, H., Ryu, S., Lim, S., and Choy, H.E. (2004) ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Biol Chem* **279**: 34183-34190.
- Stambuk, S., and Radman, M. (1998) Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. *Genetics* **150**: 533-542.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J.B., Givskov, M., and Molin, S. (1999) Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4108-4117.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Studwell-Vaughan, P.S., and O'Donnell, M. (1993) DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*. *J Biol Chem* **268**: 11785-11791.
- Sun, J., Kelemen, G.H., Fernandez-Abalos, J.M., and Bibb, M.J. (1999) Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145** (Pt 9): 2221-2227.
- Sun, J., Hesketh, A., and Bibb, M. (2001) Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spot* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **183**: 3488-3498.
- Taddei, F., Matic, I., and Radman, M. (1995) cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11736-11740.
- Taddei, F., Hayakawa, H., Bouton, M., Cirinesi, A., Matic, I., Sekiguchi, M., and Radman, M. (1997a) Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science* **278**: 128-130.
- Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P.H., and Godelle, B. (1997b) Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**: 700-702.
- Taft-Benz, S.A., and Schaaper, R.M. (2004) The theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III: a role in stabilizing the epsilon proofreading subunit. *J Bacteriol* **186**: 2774-2780.
- Tago, Y., Imai, M., Ihara, M., Atofuji, H., Nagata, Y., and Yamamoto, K. (2005) *Escherichia coli* mutator (Delta)polA is defective in base mismatch correction: the nature of *in vivo* DNA replication errors. *J Mol Biol* **351**: 299-308.
- Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M.J., Wang, L., Li, W., Buttner, M.J., Deng, Z.X., and Chater, K.F. (2003) A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **50**: 475-486.

- Tan, H., Yang, H., Tian, Y., Wu, W., Whatling, C.A., Chamberlin, L.C., Buttner, M.J., Nodwell, J., and 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.
- Tang, M., Shen, X., Frank, E.G., O'Donnell, M., Woodgate, R., and 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.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., and Matthews, R.G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13471-13476.
- Taylor, C.M., Beresford, M., Epton, H.A., Sigee, D.C., Shama, G., Andrew, P.W., and Roberts, I.S. (2002) *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J Bacteriol* **184**: 621-628.
- Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M., and Kivisaar, M. (2004) Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **186**: 2735-2744.
- Teich, A., Meyer, S., Lin, H.Y., Andersson, L., Enfors, S., and Neubauer, P. (1999) Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators sigmaS and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **15**: 123-129.
- Tenaillon, O., Taddei, F., Radmian, M., and Matic, I. (2001) Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* **152**: 11-16.
- Thompson, C.J., Fink, D., and Nguyen, L.D. (2002) Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* **3**: REVIEWS1020.
- Tompkins, J.D., Nelson, J.L., Hazel, J.C., Leugers, S.L., Stumpf, J.D., and Foster, P.L. (2003) Error-prone polymerase, DNA polymerase IV, is responsible for transient hypermutation during adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 3469-3472.
- Touloukhonov, II, Shulgina, I., and 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.
- Trautinger, B.W., Jaktaji, R.P., Rusakova, E., and Lloyd, R.G. (2005) RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Mol Cell* **19**: 247-258.
- Tsui, H.C., Feng, G., and Winkler, M.E. (1997) Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**: 7476-7487.
- van Delden, C., Comte, R., and Bally, A.M. (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 5376-5384.

- van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J., and Jones, J.D. (2000) *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3747-3752.
- Vijayakumar, S.R., Kirchhof, M.G., Patten, C.L., and Schellhorn, H.E. (2004) RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random *lacZ* fusion mutagenesis. *J Bacteriol* **186**: 8499-8507.
- Volff, J.N. (1994) Stimulation de l'instabilité génétique et des réarrangements génomiques chez *Streptomyces ambofaciens*. In *Laboratoire de Génétique et Microbiologie* Nancy: Henri Poincaré.
- Volff, J.N., and Altenbuchner, J. (2000) A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 143-150.
- Vrentas, C.E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R.H., and Gourse, R.L. (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev* **19**: 2378-2387.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., and Radman, M. (1997) Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9763-9767.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R.P., and Nohmi, T. (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell* **4**: 281-286.
- Watanabe-Akanuma, M., Woodgate, R., and Ohta, T. (1997) Enhanced generation of A:T-->T:A transversions in a *recA730 lexA51(Def)* mutant of *Escherichia coli*. *Mutat Res* **373**: 61-66.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**: 4585-4592.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., and Hengge, R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**: 1591-1603.
- Weil, J.H. (1983) *Biochimie Générale*. Paris.
- Wendrich, T.M., and Marahiel, M.A. (1997) Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **26**: 65-79.
- Wendrich, T.M., Blaha, G., Wilson, D.N., Marahiel, M.A., and Nierhaus, K.H. (2002) Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**: 779-788.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.

- Willey, J., Schwedock, J., and 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.
- Wong, I., Lundquist, A.J., Bernards, A.S., and Mosbaugh, D.W. (2002) Presteady-state analysis of a single catalytic turnover by *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase reveals a "pinch-pull-push" mechanism. *J Biol Chem* **277**: 19424-19432.
- Worth, L., Jr., Clark, S., Radman, M., and 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., Longacre, A., and Reimers, J.M. (1999) Hypermutation in derepressed operons of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5089-5094.
- Wright, B.E. (2000) A biochemical mechanism for nonrandom mutations and evolution. *J Bacteriol* **182**: 2993-3001.
- Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., and Finkel, S.E. (2002) SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8737-8741.
- Zambrano, M.M., and Kolter, R. (1993) *Escherichia coli* mutants lacking NADH dehydrogenase I have a competitive disadvantage in stationary phase. *J Bacteriol* **175**: 5642-5647.
- Zhang, Q.M., Ishikawa, N., Nakahara, T., and 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.
- Zhou, Y., and Gottesman, S. (1998) Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. *J Bacteriol* **180**: 1154-1158.
- Zinser, E.R., and Kolter, R. (1999) Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J Bacteriol* **181**: 5800-5807.
- Zinser, E.R., and Kolter, R. (2000) Prolonged stationary-phase incubation selects for lrp mutations in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 4361-4365.
- Zinser, E.R., Schneider, D., Blot, M., and Kolter, R. (2003) Bacterial evolution through the selective loss of beneficial Genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* **164**: 1271-1277.

Mademoiselle GENAY Magali

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en GENETIQUE MOLECULAIRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *11/01/06*

Nancy, le *29/11/06*

Le Président de l'Université



Résumé

Dans la nature, les organismes sont constamment soumis à des variations de l'environnement, de nature chimique, physique ou nutritionnelle. La modulation du taux de mutation constitue un des mécanismes contribuant à l'adaptation des espèces bactériennes à de rapides changements environnementaux et, à plus long terme, à l'évolution de ces espèces.

L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence l'action de facteurs environnementaux sur l'instabilité génétique chez *Streptomyces*. Au travers de l'étude de mutants nommés Pig⁻pap de *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*, dépigmentés et non sporulants, produits lors de la formation du mycélium aérien sous forme de papilles blanches sur les colonies, nous avons montré qu'une limitation en acides aminés modifiait la stabilité du génome. En effet, sur des milieux pauvres en acides aminés, la production de ces mutants était fortement augmentée. Une mutation dans leurs gènes *whiG* ou *whiH*, deux gènes intervenant dans les premières étapes du processus de sporulation, a fréquemment été détectée.

La réponse stringente étant la réponse physiologique se mettant en place lors d'une limitation en acides aminés, notre démarche a consisté à étudier la capacité à produire des papilles d'un mutant *relA* de *S. coelicolor*, incapable de synthétiser du (p)ppGpp, l'hormone nécessaire au déclenchement de la réponse stringente. Ce mutant ne produisait pas de papilles blanches sur ses colonies, même sur un milieu limité en acides aminés. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'un lien entre réponse stringente et production de mutants Pig⁻pap, c'est-à-dire entre réponse stringente et augmentation de la mutabilité des gènes *whiG* et *whiH*.

Il existe ainsi une relation entre une limitation nutritive et une augmentation de l'instabilité génétique *via* l'établissement d'un état mutateur global ou localisé, initié par le déclenchement de la réponse stringente. Les mutants ainsi produits lors de conditions de limitation en acides aminés pourraient contribuer à la survie de la colonie de *Streptomyces* dans de telles conditions en métabolisant des substances différentes du reste de la colonie ou en permettant le relargage de nutriments, nourriture pour les cellules voisines.

Mots clés : *Streptomyces*, réponse stringente, instabilité génétique, différenciation, limitation nutritionnelle.