

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

**Laboratoire de Génétique et Microbiologie  
Faculté des Sciences de l'UHP Nancy1  
UMR INRA 1128 IFR 110 Vandoeuvre-lès-Nancy**

**Bernard DECARIS  
Annie DARY**



# La dynamique mutationnelle

## Création d'un polymorphisme génétique

⇒ Survie dans de nouveaux environnements

**Mutations géniques**

**Réarrangements génomiques**

**Transferts horizontaux**

 **Rôle important dans l'évolution des espèces**

**Mutations géniques**

**Réarrangements génomiques**

**Transferts horizontaux**

 **Rôle important dans l'évolution des espèces**

Mutations géniques

Réarrangements génomiques

Transferts horizontaux

⇒ Rôle important dans l'évolution des espèces

**Mutations géniques**

**Réarrangements génomiques**

**Transferts horizontaux**

 **Rôle important dans l'évolution des espèces**

**Mutations géniques**

**Réarrangements génomiques**

**Transferts horizontaux**

 **Rôle important dans l'évolution des espèces**

# Modulation du taux de mutation



# La dynamique mutationnelle chez *Streptomyces*

## Habitat : sol

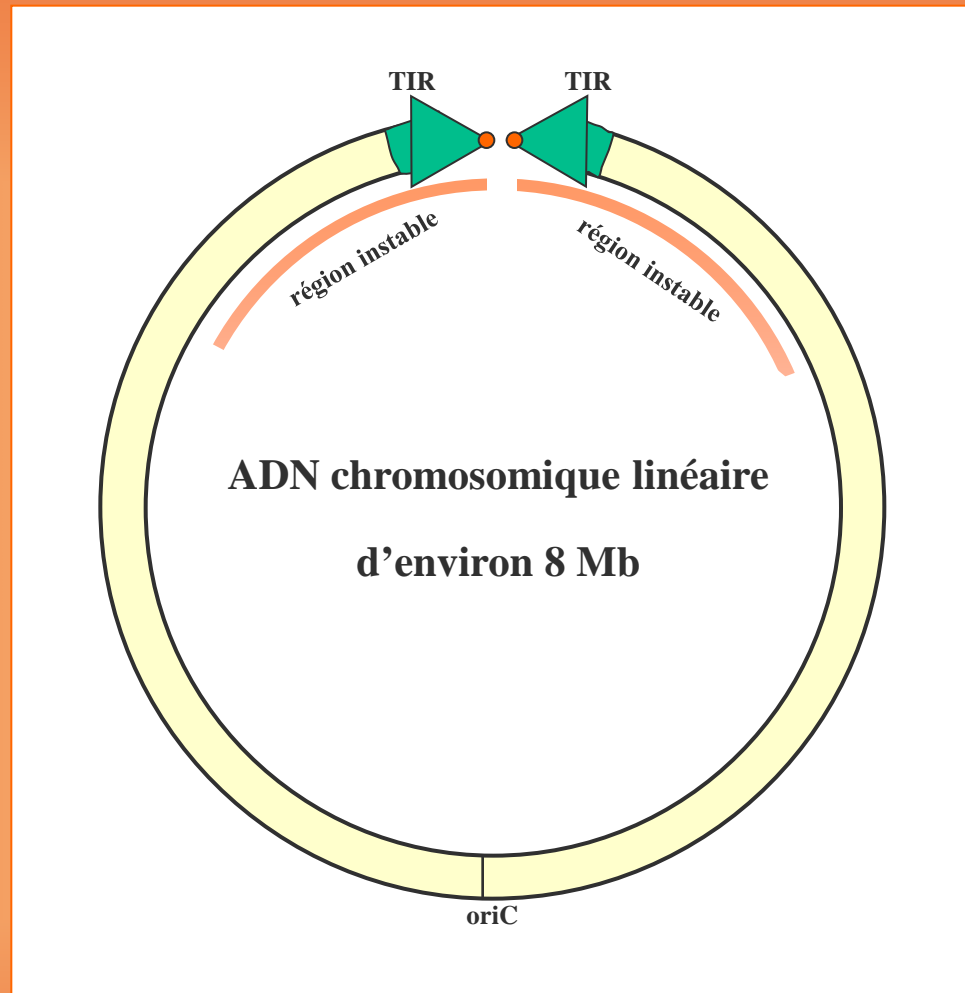
- ⇒ Hétérogénéité du milieu
- ⇒ Diversification des populations

## Production de métabolites

- ⇒ Métabolites à activité variée
- ⇒ Lutte contre les flores environnantes

## Instabilité génétique

- ⇒ Réarrangements génomiques



## *Introduction*

## Habitat : sol

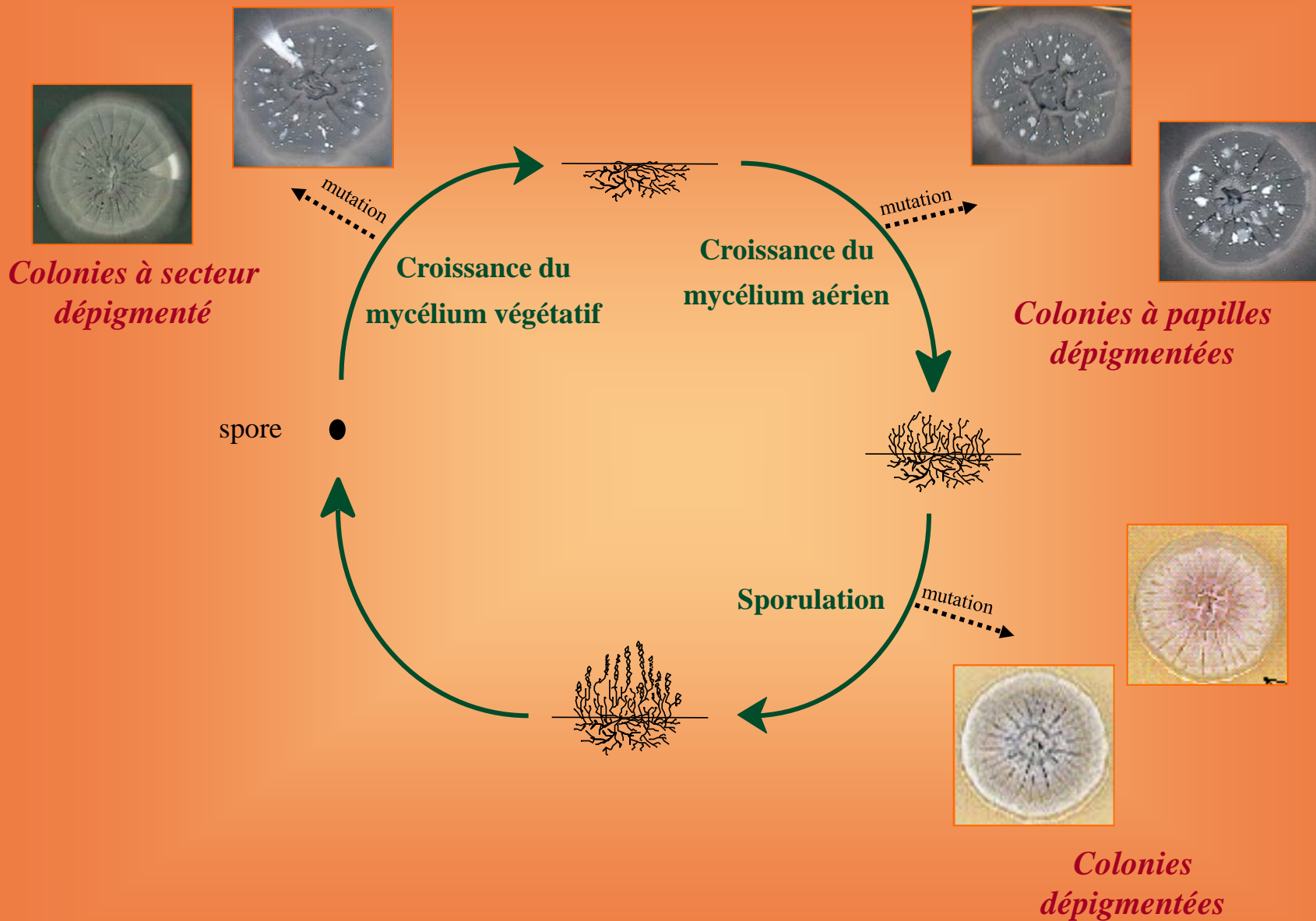
- ➡ Hétérogénéité du milieu
- ➡ Diversification des populations

## Production de métabolites

- ➡ Métabolites à activité variée
- ➡ Lutte contre les flores environnantes

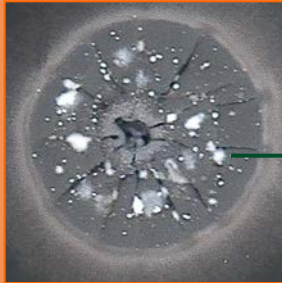
## Instabilité génétique

- ➡ Réarrangements génomiques
- ➡ Caractère instable : la pigmentation des colonies



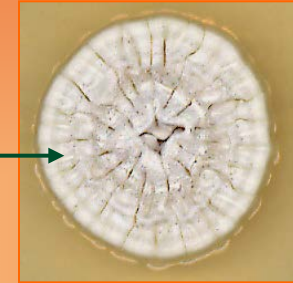
## Introduction

# Les mutants Pig-pap



*une colonie à papilles dépigmentées*

Sous-clonage d'une papille



*un mutant Pig<sub>pap</sub>*

- ils sont produits à haute fréquence
- ils sont totalement dépigmentés
- ils sont non sporulants
- ils sont stables phénotypiquement
- ils ne présentent aucun réarrangement de grande taille

➡ **Nouvel aspect de l'instabilité génétique**

# OBJECTIF

**Recherche des gènes cibles de l'instabilité génétique  
chez les mutants Pig-pap**

# 1<sup>ère</sup> stratégie

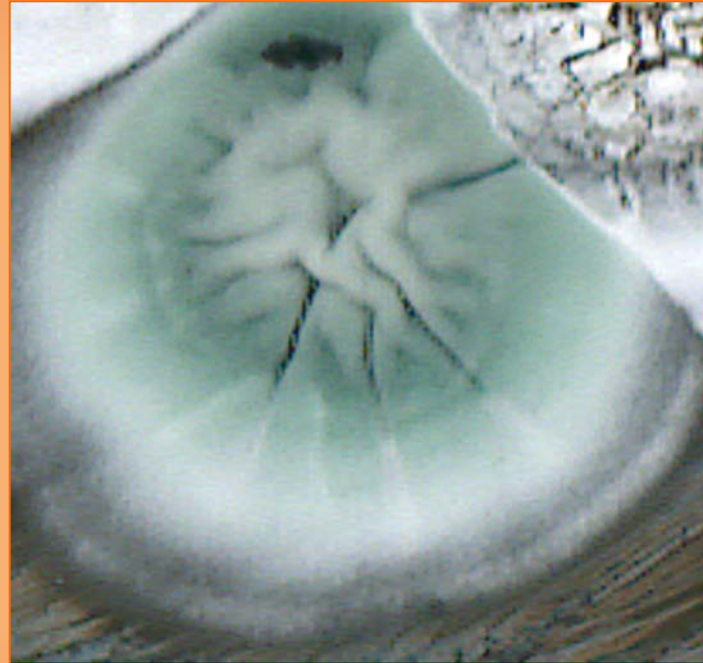
- ❖ Fabrication d'une banque d'ADN génomique de la souche sauvage chez *Escherichia coli*
- ❖ Conjugaison intergénérique entre *E. coli* et un mutant Pig-pap

1



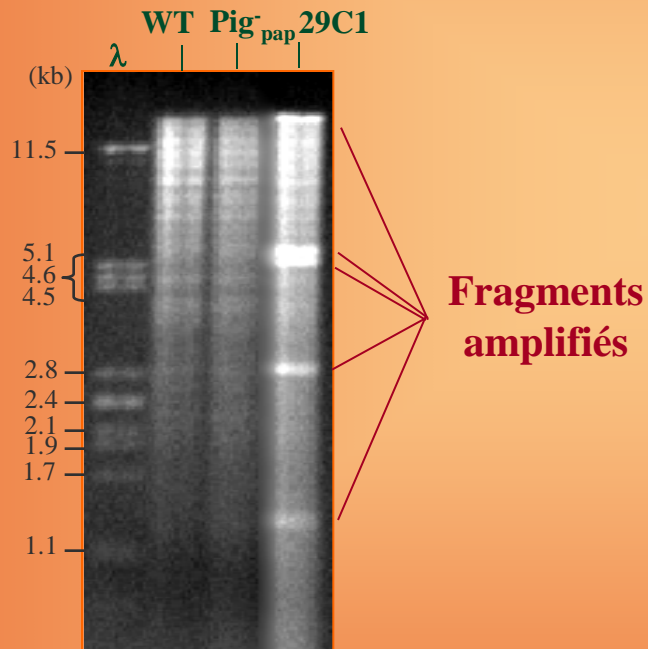
# RESULTATS (I)

## Isolement et caractérisation de la souche 29C1

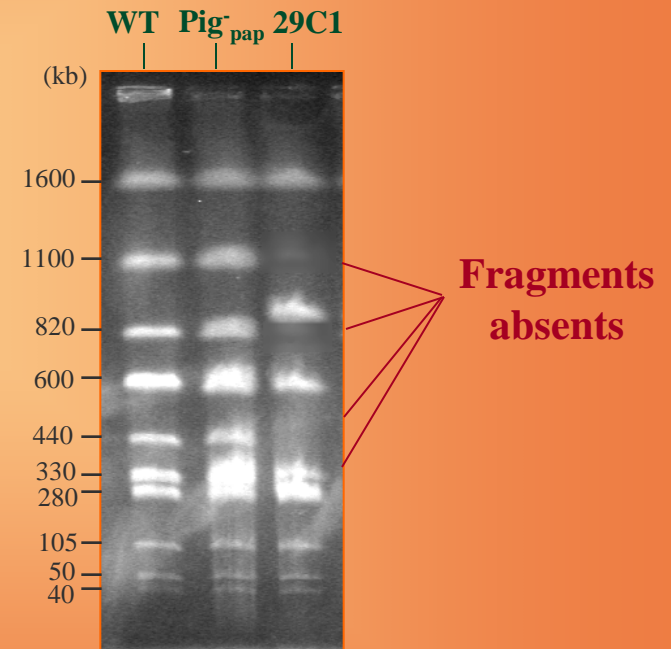


# La souche 29C1 présente de grands réarrangements génomiques

## Une amplification



## Des délétions



## Mise en évidence d'une nouvelle région amplifiable

- nommée AUD37
- située dans les TIR du chromosome

## Mise en évidence d'une nouvelle structure chromosomique

*Structure du chromosome sauvage*

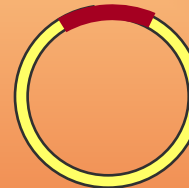


Amplification et délétions



Circularisation

Fragment qui porte l'amplification



*Structure du chromosome de 29C1*

# RESULTATS (II)

## Etude des mutants Pig-pap chez *Streptomyces*

**pap1**



**pap2**



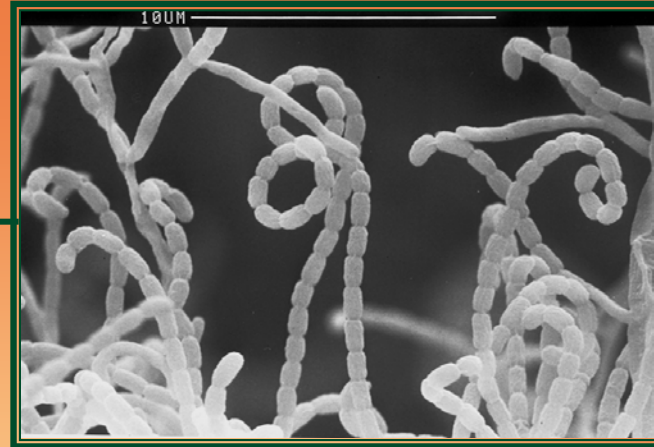
**pap3**



➡ **Issus d'événements mutationnels indépendants**



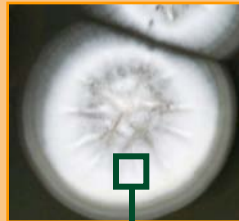
WT



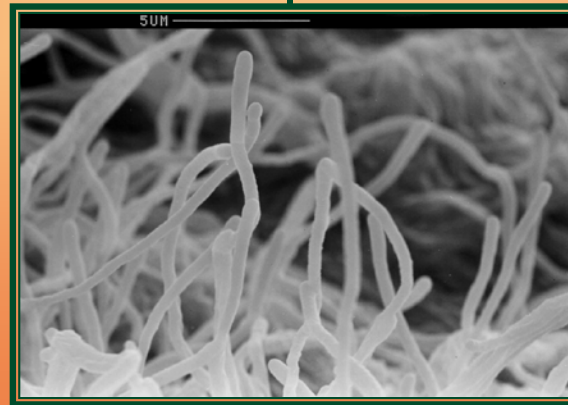
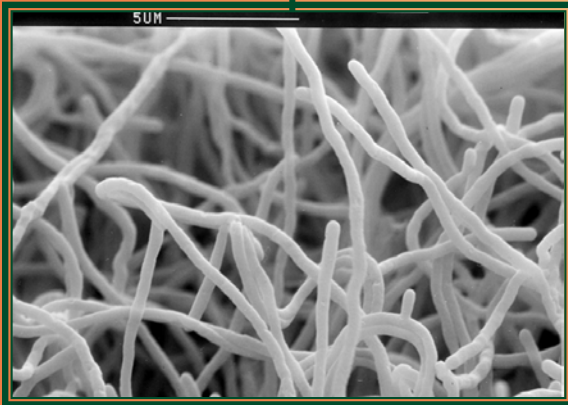
pap1



pap2

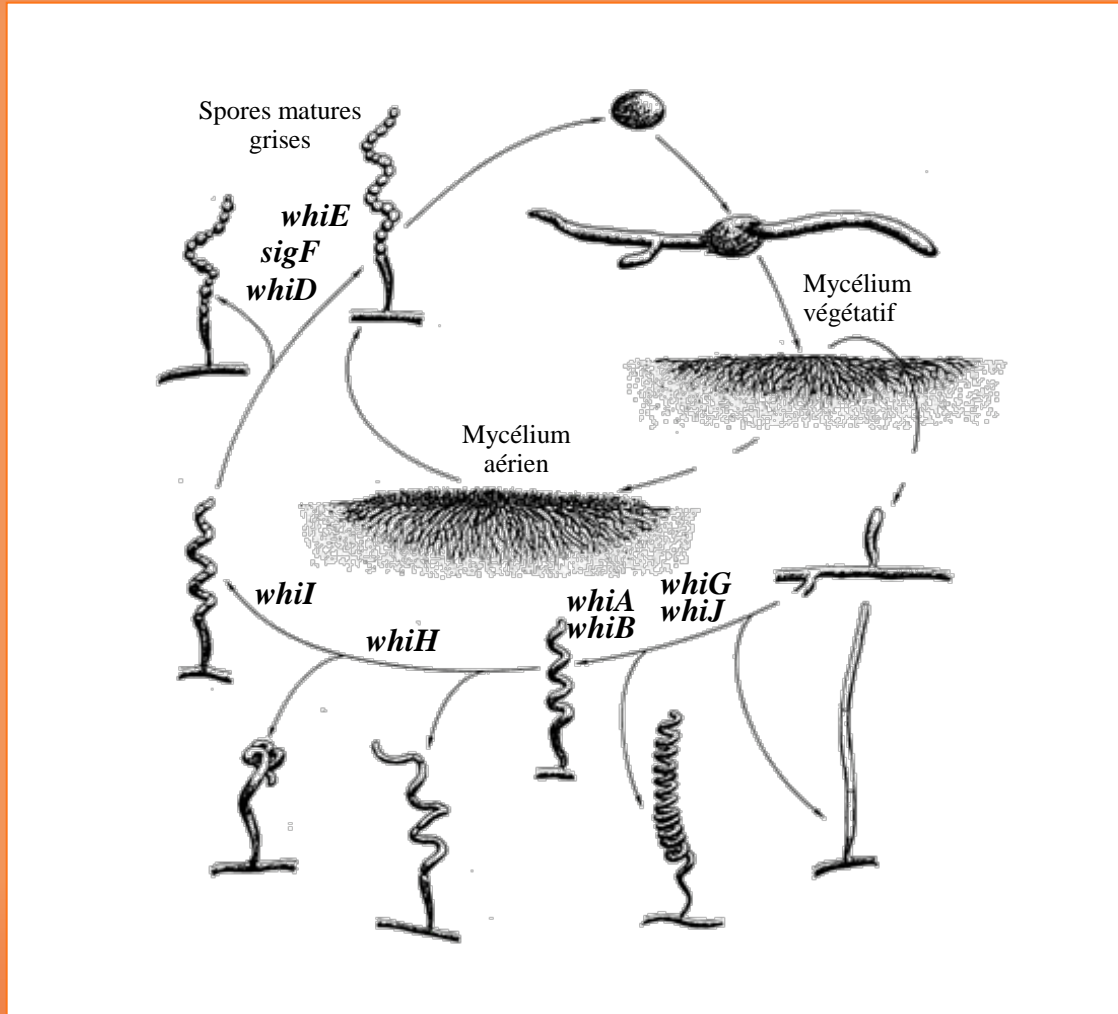


pap3

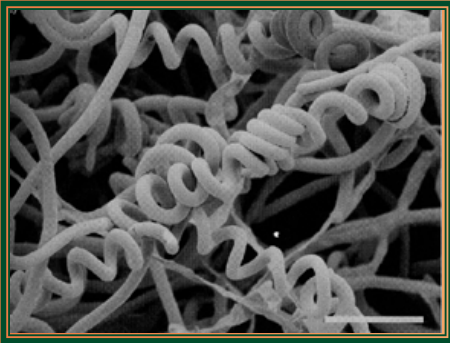


Résultats (II)

# Les mutants *whi* de *S. coelicolor*



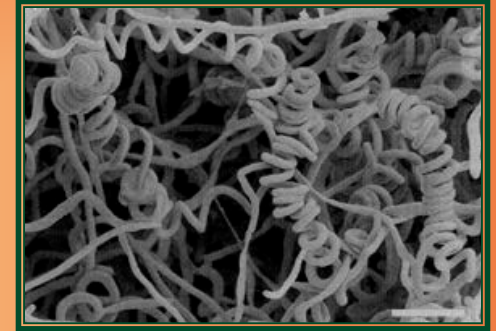




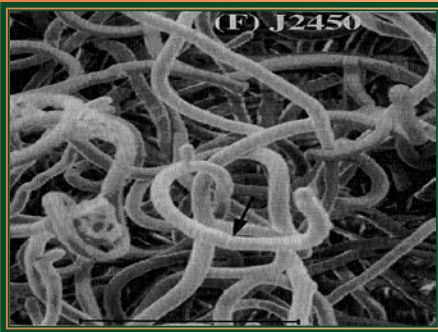
**Mutant *whiA***



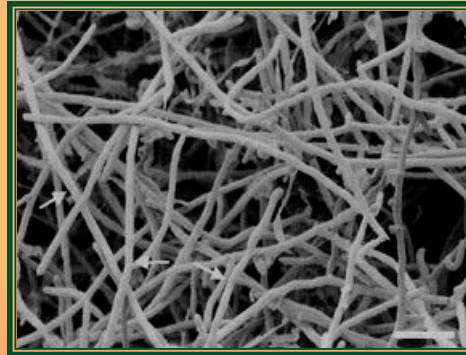
**Souche WT**



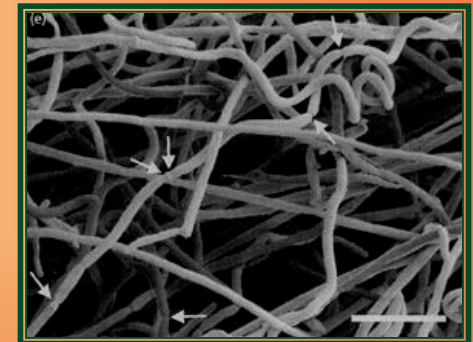
**Mutant *whiB***



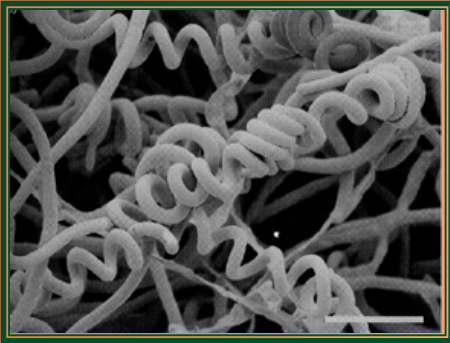
**Mutant *whiI***



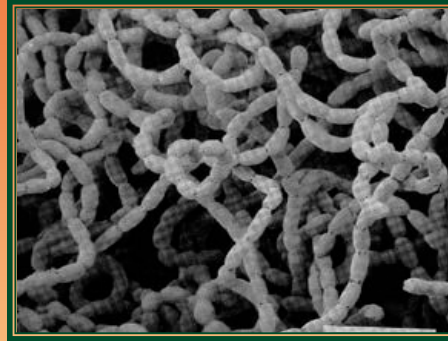
**Mutant *whiG***



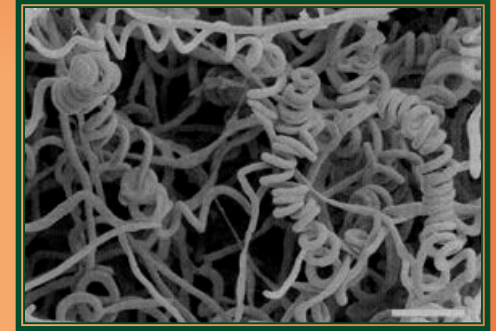
**Mutant *whiH***



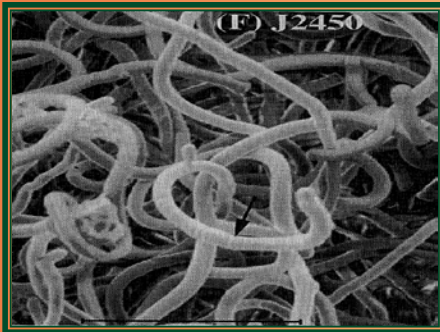
**Mutant *whiA***



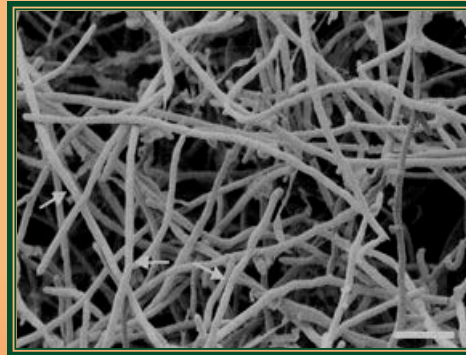
**Souche WT**



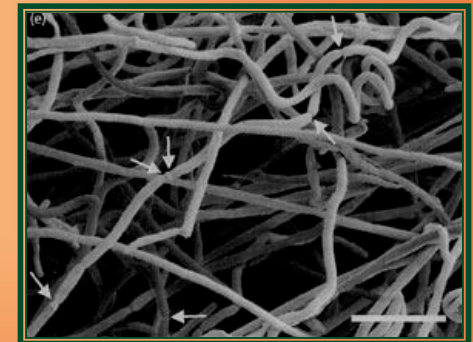
**Mutant *whiB***



**Mutant *whiI***



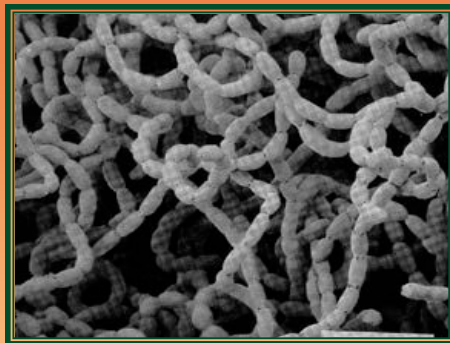
**Mutant *whiG***



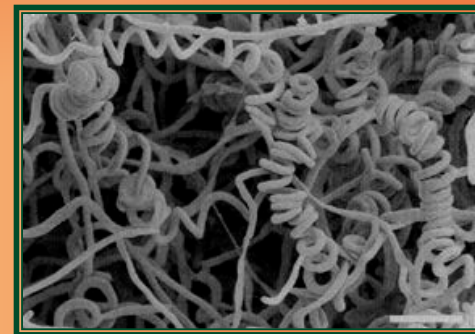
**Mutant *whiH***



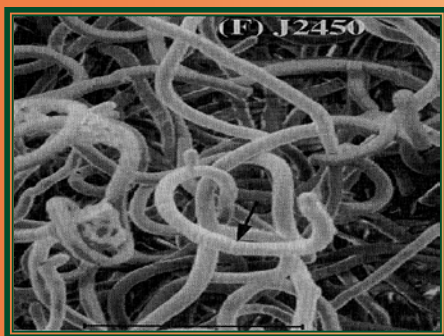
**Mutant *whiA***



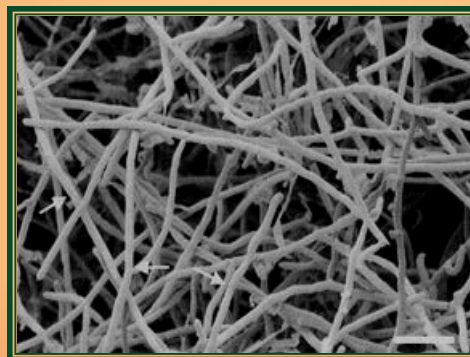
**Souche WT**



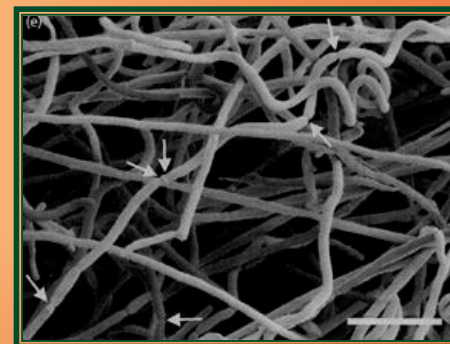
**Mutant *whiB***



**Mutant *whiI***



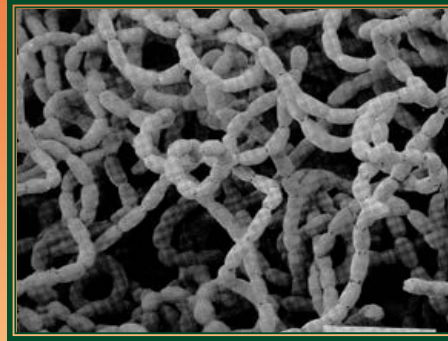
**Mutant *whiG***



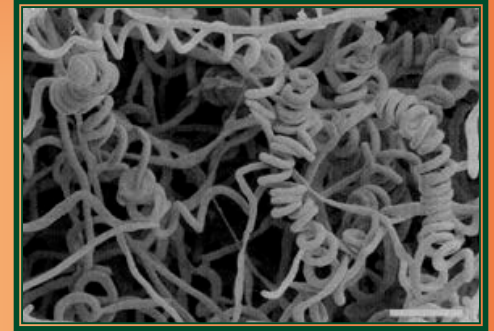
**Mutant *whiH***



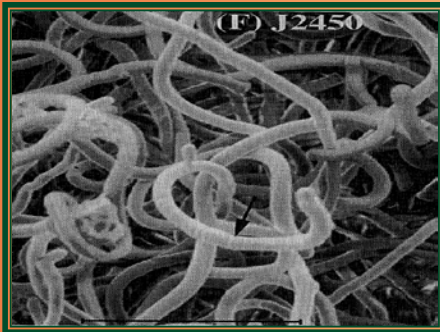
**Mutant *whiA***



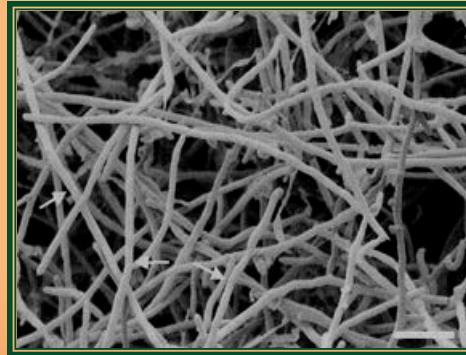
**Souche WT**



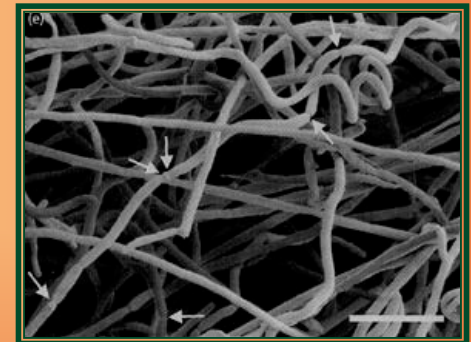
**Mutant *whiB***



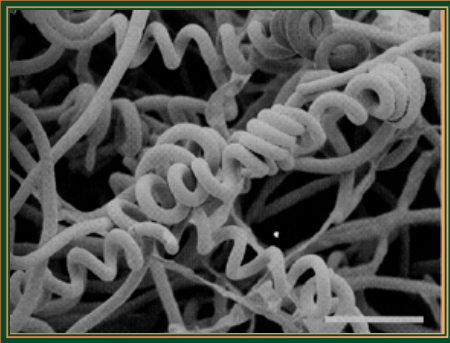
**Mutant *whiI***



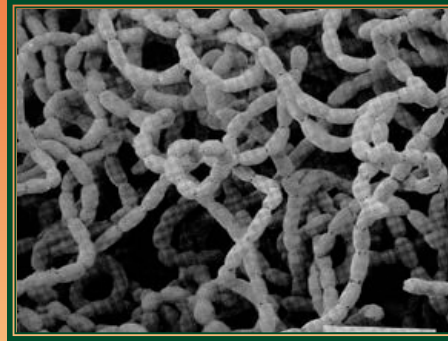
**Mutant *whiG***



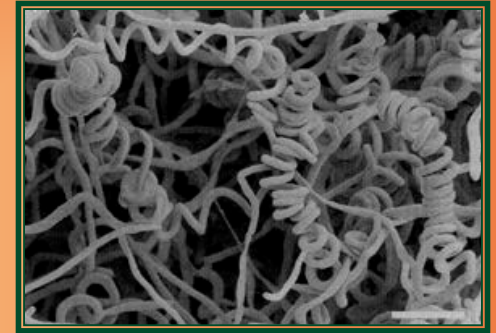
**Mutant *whiH***



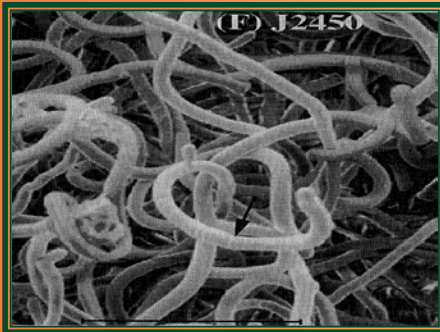
**Mutant *whiA***



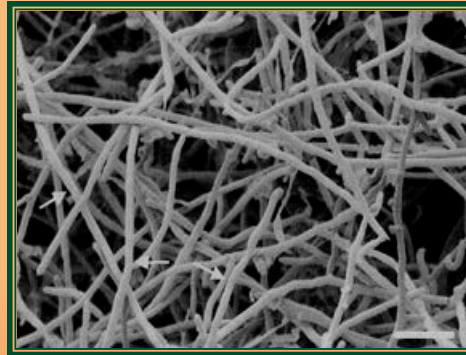
**Souche WT**



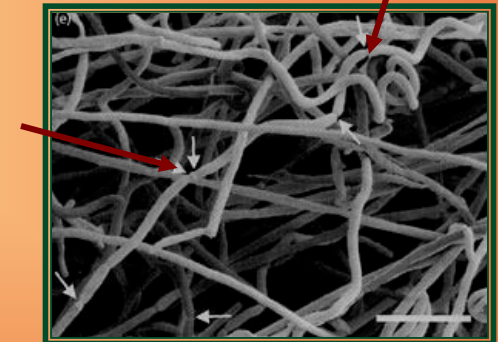
**Mutant *whiB***



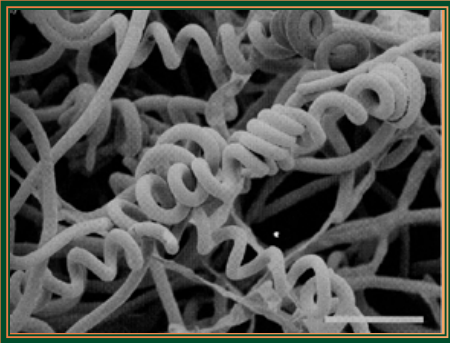
**Mutant *whiI***



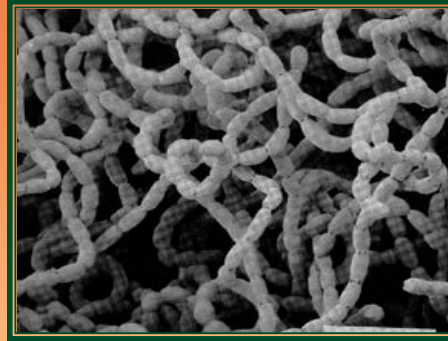
**Mutant *whiG***



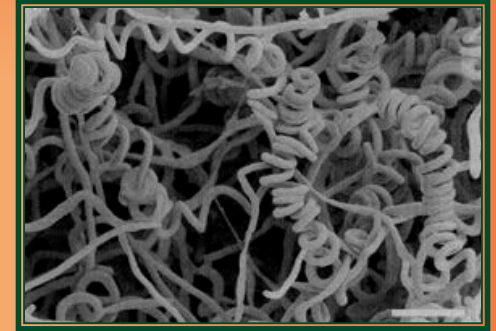
**Mutant *whiH***



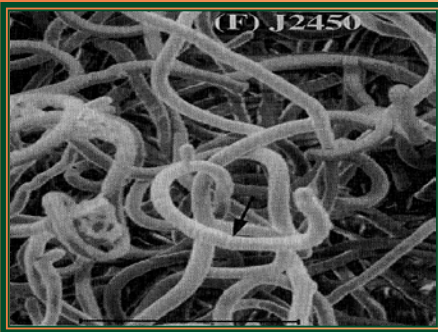
**Mutant *whiA***



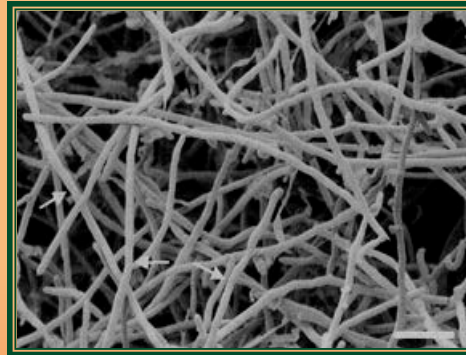
**Souche WT**



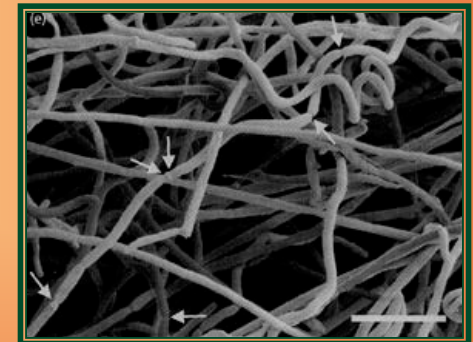
**Mutant *whiB***



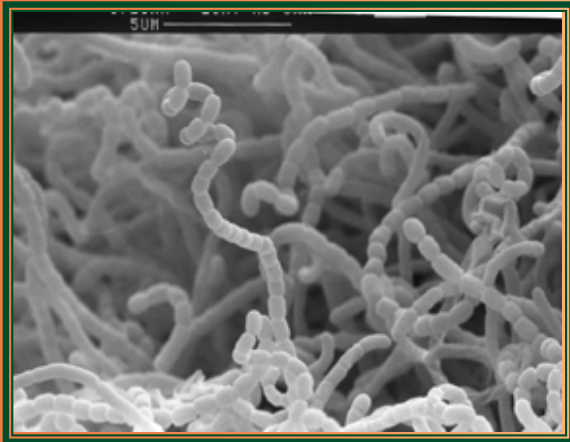
**Mutant *whiI***



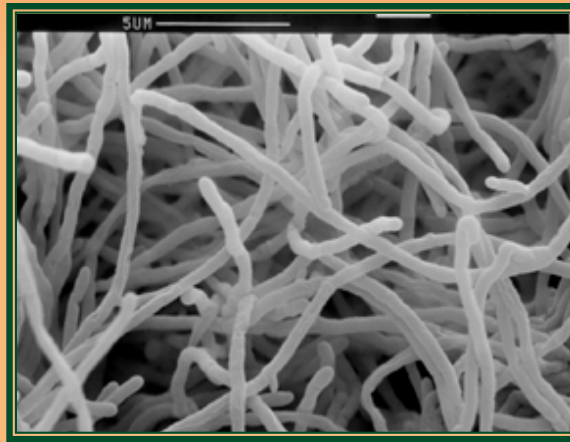
**Mutant *whiG***



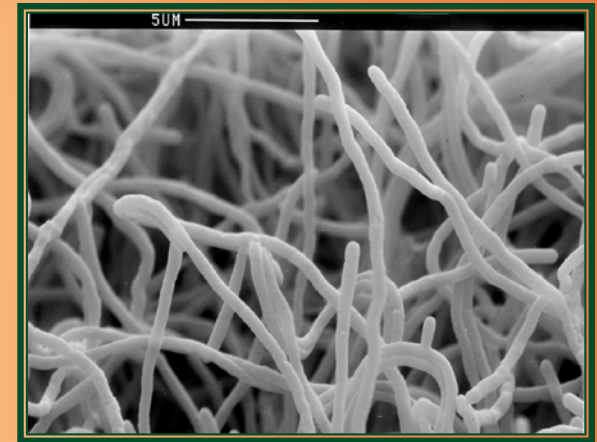
**Mutant *whiH***



**Souche M145**



**Souche C71 (*whiG71*)**

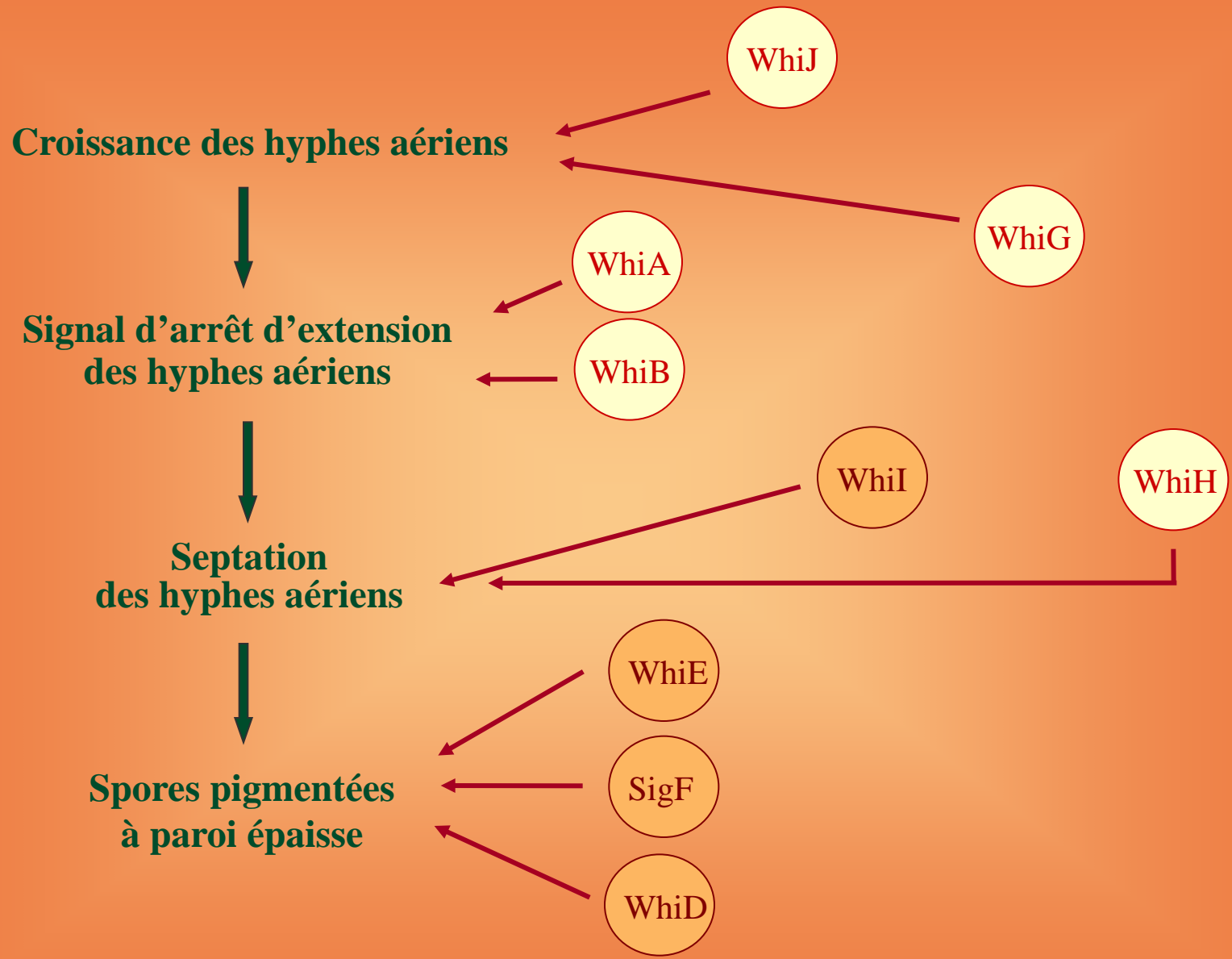


**pap1**

*Résultats (II)*

**Les mutants Pig-pap sont bloqués  
dans les premières étapes du développement**





Résultats (II)

## 2<sup>ème</sup> stratégie

- ❖ Clonage de cinq gènes *whi* (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* et *whiJ*) de *S. coelicolor*
- ❖ Introduction de chaque plasmide recombinant dans les mutants Pig-pap par conjugaison

## Pour pap1, pap2 et pap3



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

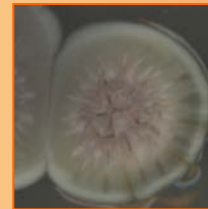


- pas de pigmentation  
- pas de sporulation

## Pour pap1, pap2



+ pSET152(*whiG*)



- pigmentation  
légèrement grise  
- sporulation

## Pour pap3

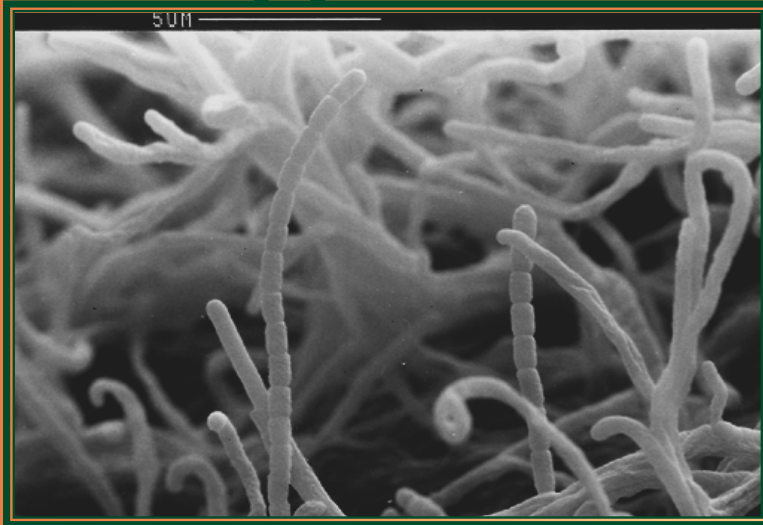


+ pSET152(*whiG*)

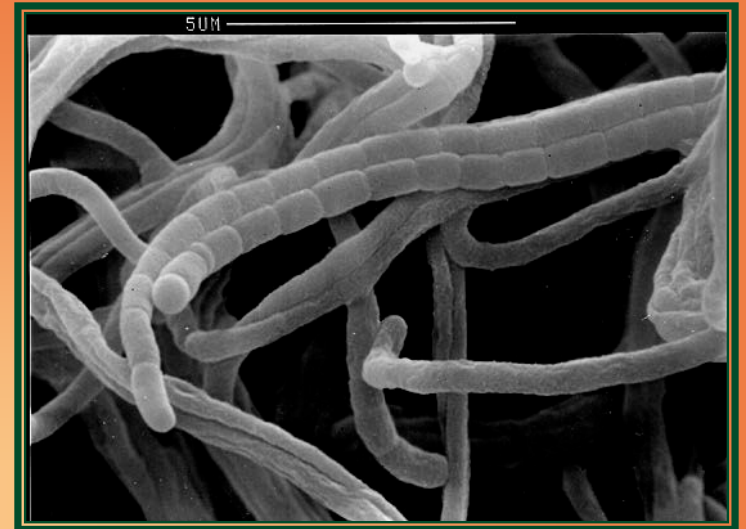


- pigmentation grise  
- sporulation  
- production de papilles

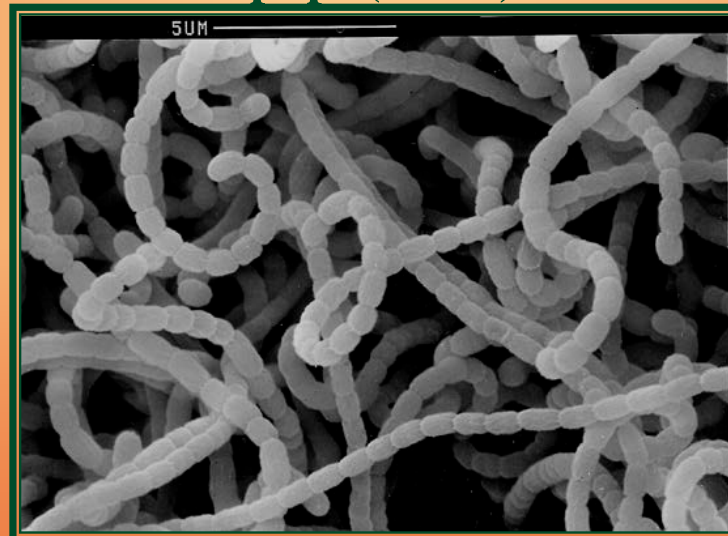
*pap1(whiG)*



*pap2(whiG)*



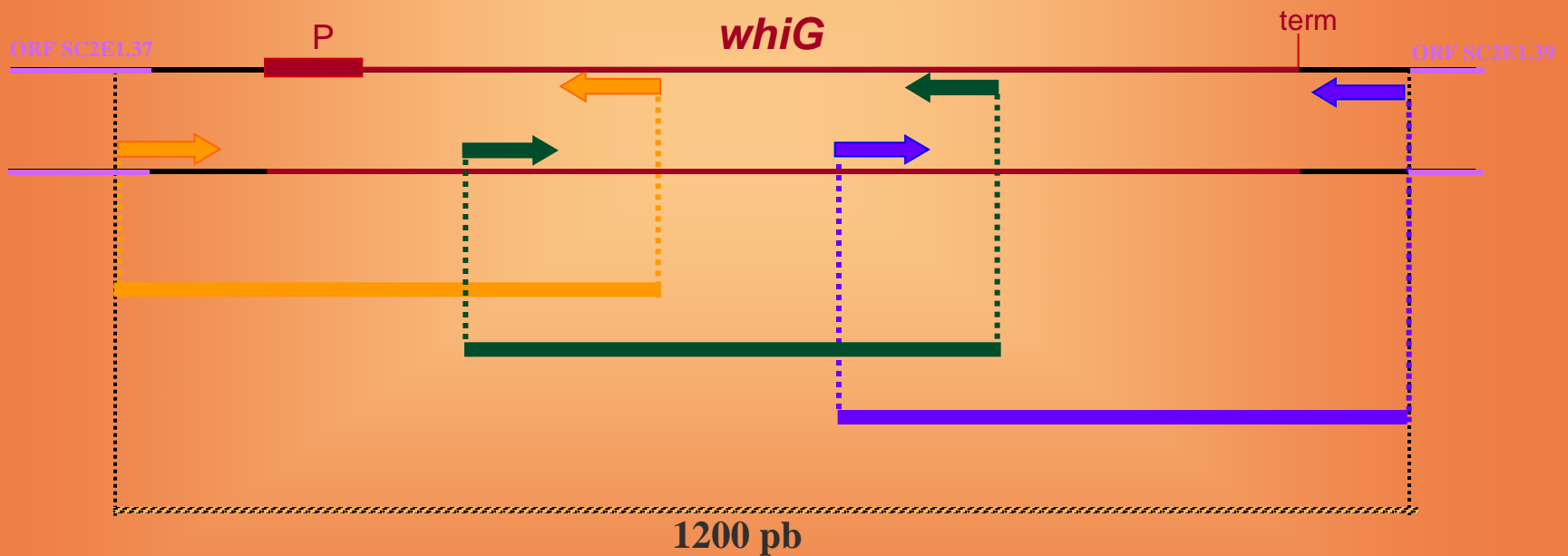
*pap3(whiG)*



*Résultats (II)*

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

# Séquençage du gène *whiG* chez *S. ambofaciens*



Résultats (II)

↪ La séquence *whiG* de *S. ambofaciens* présente 90,2 % d'identité en nucléotides et 98,4 % d'identité en acides aminés avec celle de *S. coelicolor*.

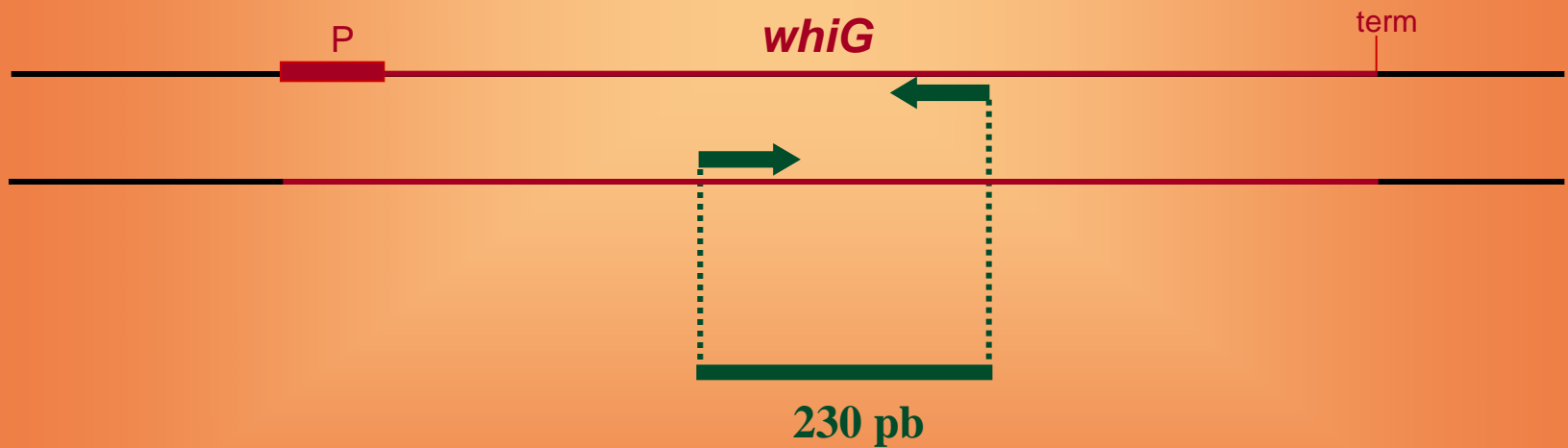
↪ Aucune différence nucléotidique dans la séquence *whiG* de la souche WT8 et des mutants *pap1*, *pap2* et *pap3* n'a été détectée.

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



# Extraction des ARN

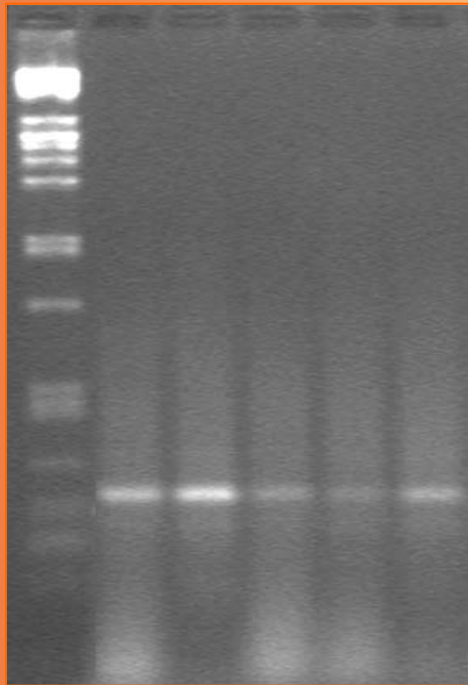
## RT-PCR



# Transcription *whiG*

sporulation  
mycélium aérien  
mycélium végétatif

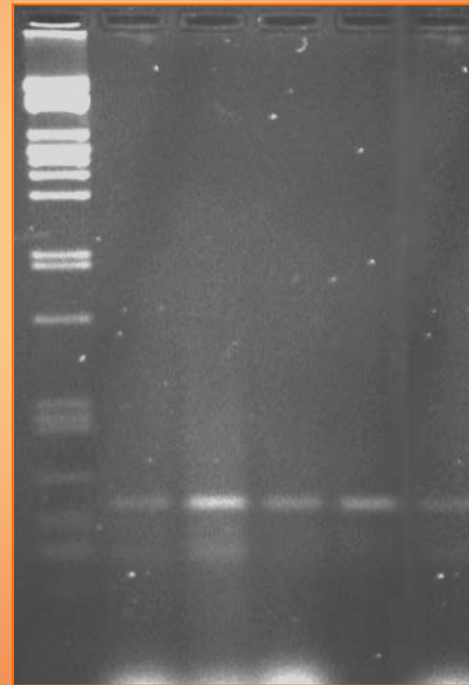
λ 14h 24h 48h 72h 96h



WT8

sporulation  
mycélium aérien  
mycélium végétatif

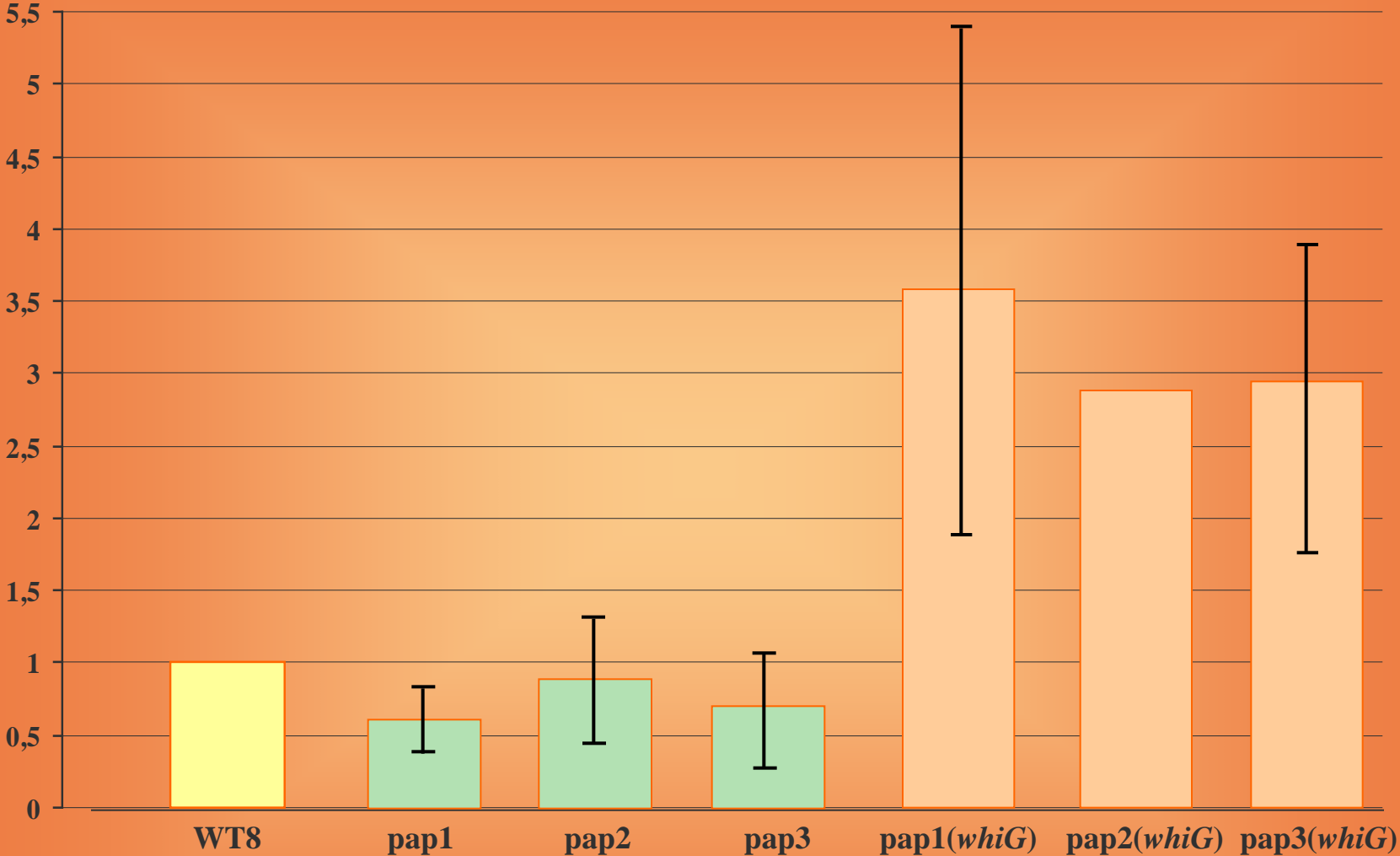
λ 14h 24h 48h 72h 96h



*pap1*

Résultats (II)

Niveau de transcription relatif de *whiG*



Le gène *whiG* est-il traduit chez les mutants Pig-pap ?

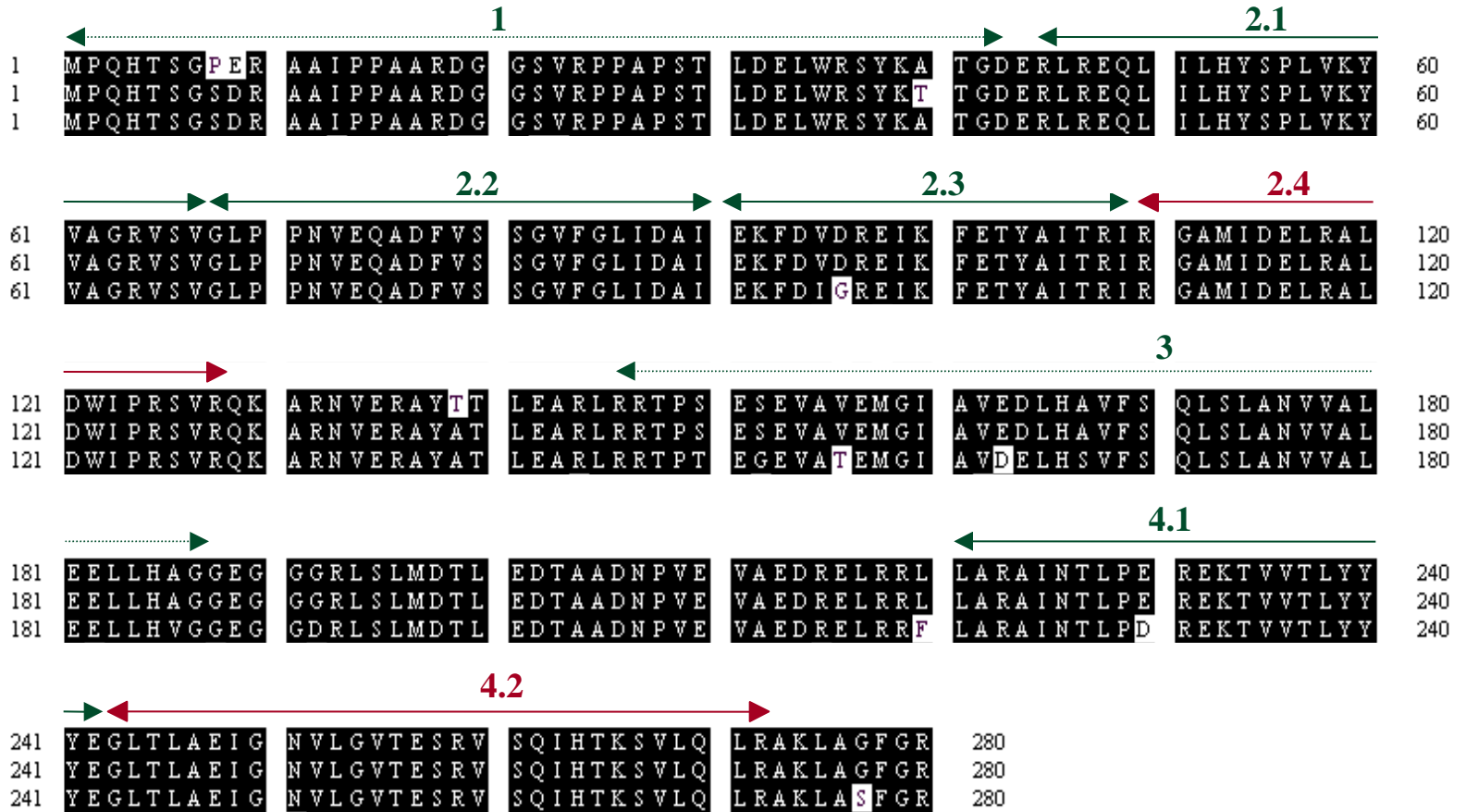
Le facteur  $\sigma^{\text{WhiG}}$  est-il fonctionnel chez les mutants Pig-pap ?

Essai de détection de la protéine WhiG

Le gène *whiH* est régulé par  $\sigma^{\text{WhiG}}$

# WhiG

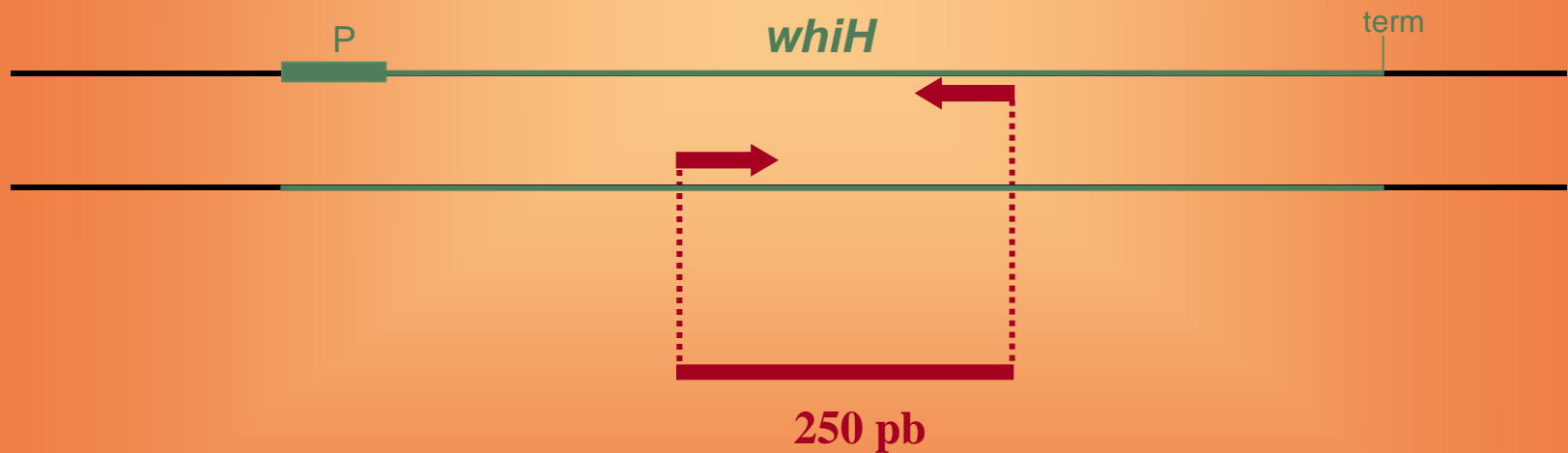
*S. ambofaciens*  
*S. coelicolor*  
*S. aureofaciens*



Le gène *whiH* est-il transcrit chez les mutants Pig-pap ?

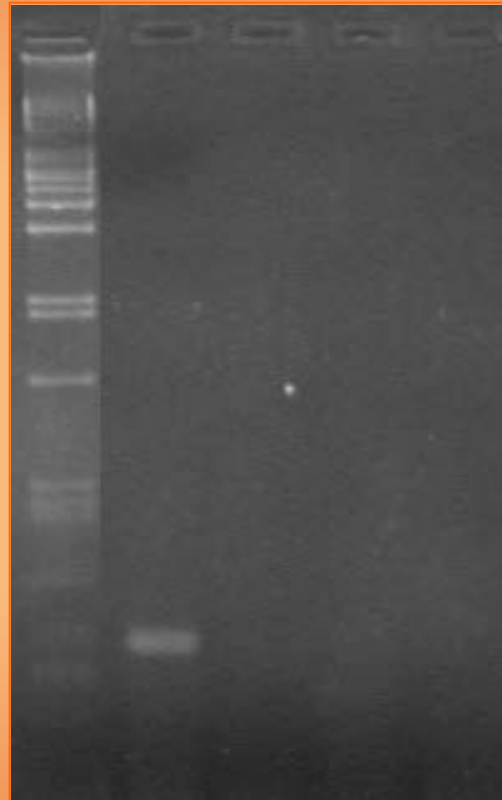
# Extraction des ARN à 48 h

## RT-PCR



# Transcription *whiH*

$\lambda$  WT8 pap1 pap2 pap3



← 250 pb

Résultats (II)



**Le facteur  $\sigma^{\text{WhiG}}$  ne serait pas fonctionnel  
chez les mutants Pig-pap**

*Résultats (II)*



**pap3**

+ pSET152(*whiG*)  
----->



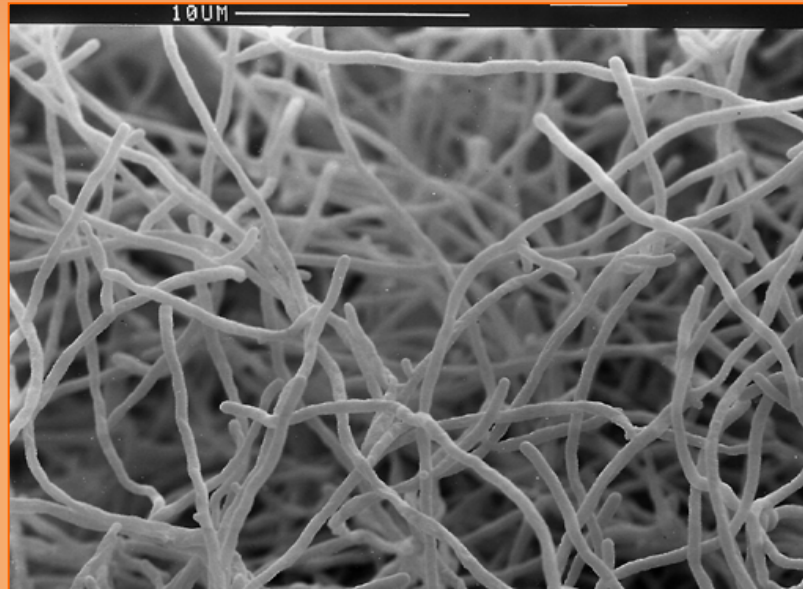
**pap3(*whiG*)**



**Nature moléculaire des mutants ?**

**Caractérisation de dix mutants**

**issus d'événements mutationnels indépendants**



**pap3Gp2**

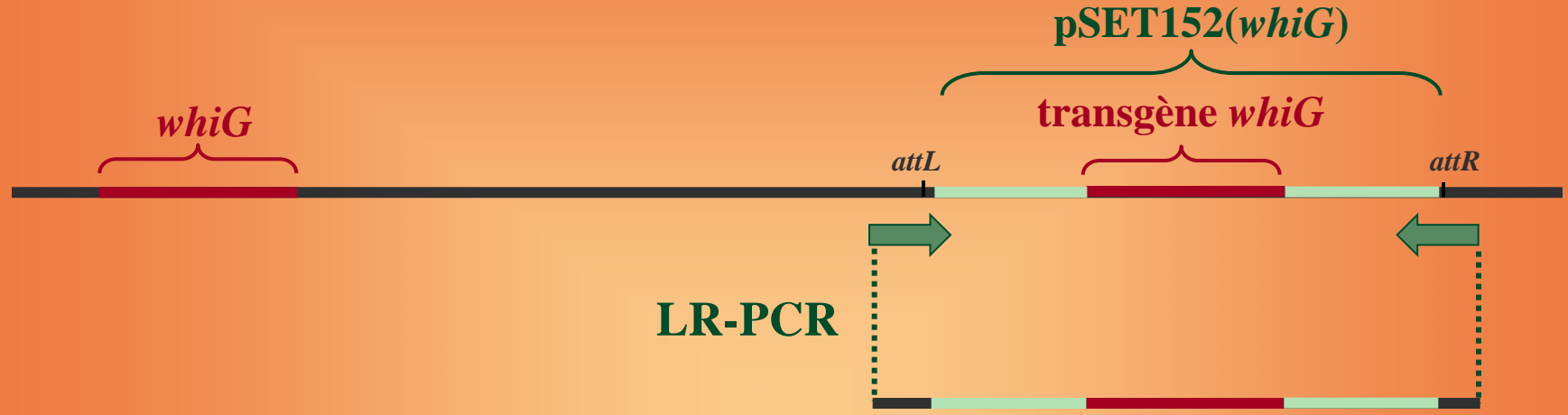
*Résultats (II)*

Les dix mutants ne présentent aucun réarrangement génomique de grande taille

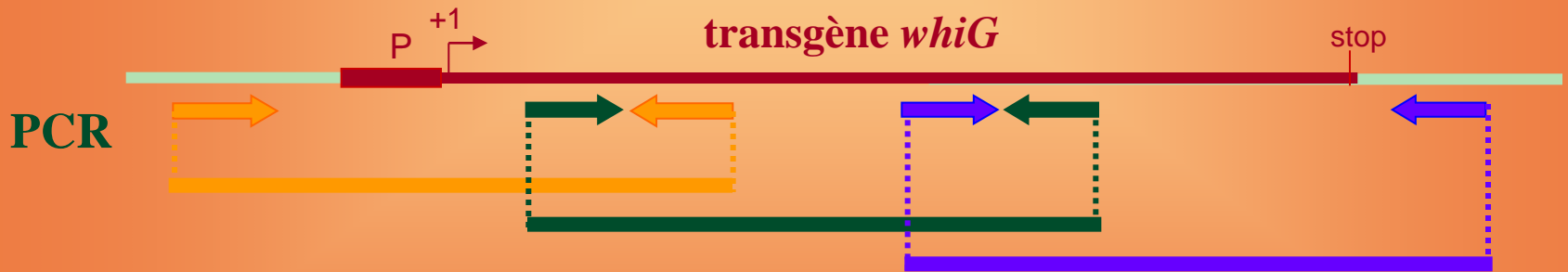
Le transgène *whiG* est-il présent dans le génome des mutants ?

Cinq mutants ont perdu le plasmide pSET152(*whiG*)

# Séquençage du transgène *whiG*



LR-PCR



PCR

⇒ séquençage

Résultats (II)

pap3Gp1



pap3Gp2



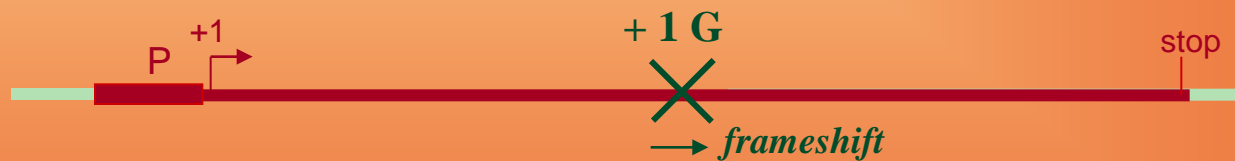
pap3Gp4



pap3Gp5



pap3Gp7



Résultats (II)

# Le transgène *whiG*

est une cible d'événements mutationnels

# RESULTATS (III)

## Facteurs modulant la mutabilité chez *Streptomyces*



# **La fréquence de production de mutants Pig-pap est modulée par les nutriments**

**Facteur nutritif influençant la production de papilles ?**

**Elaboration de milieux dérivant du milieu HT**

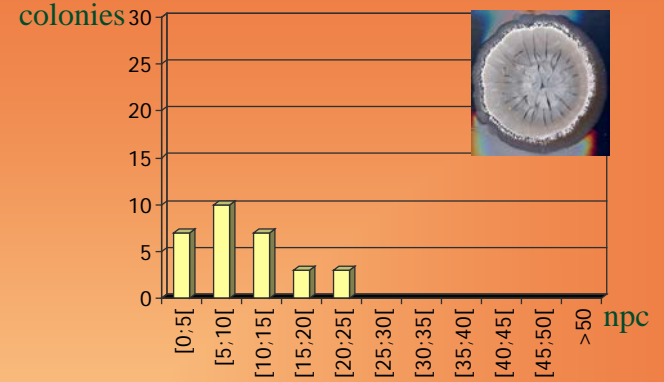
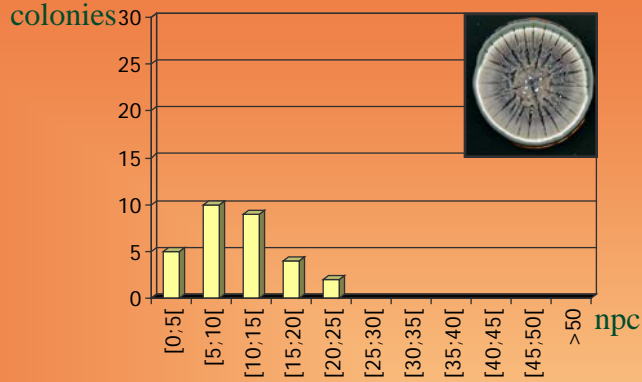
**La bacto tryptone influence fortement  
la production de papilles blanches sur les colonies**

*Résultats (III)*

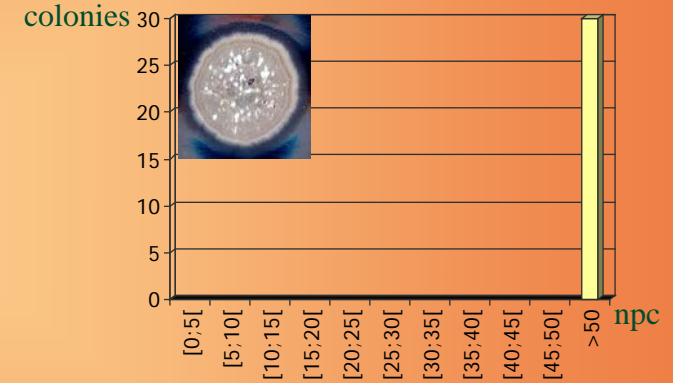
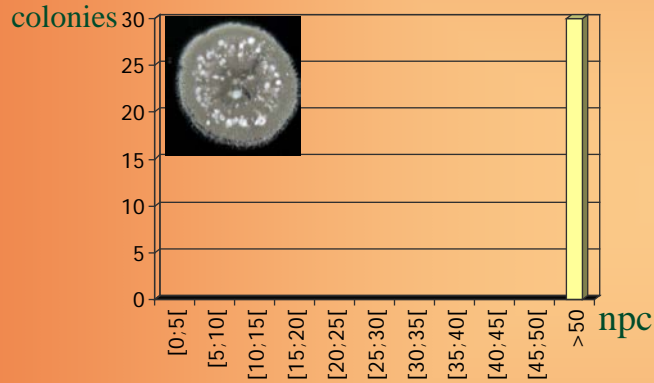
Pour *S. ambofaciens* WT8

Pour *S. coelicolor* M600

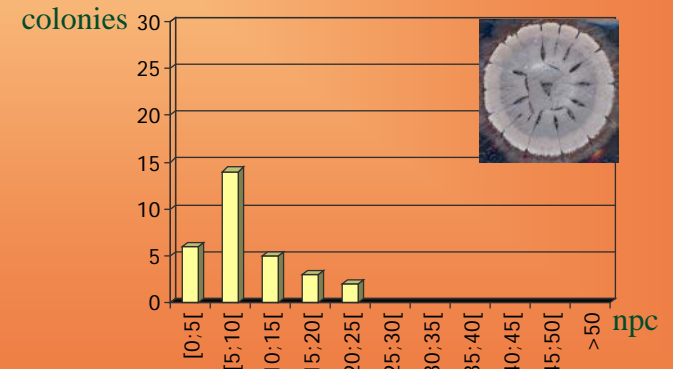
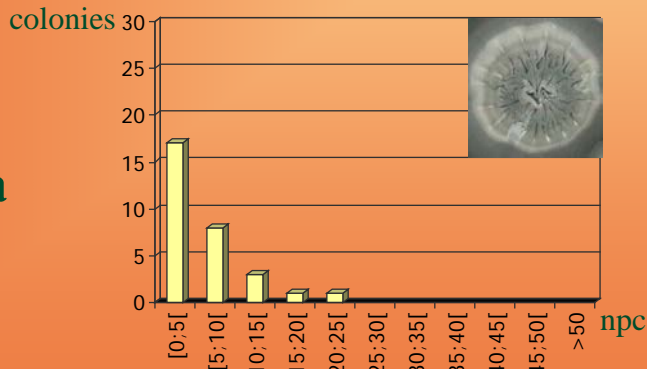
HT



HTC



HTC+aa



Résultats (III)

# Les mutants isolés de papilles obtenues sur milieu carencé

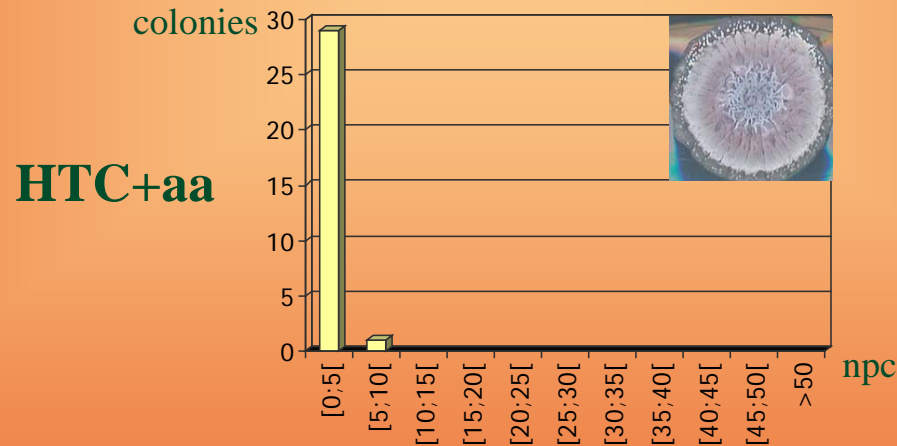
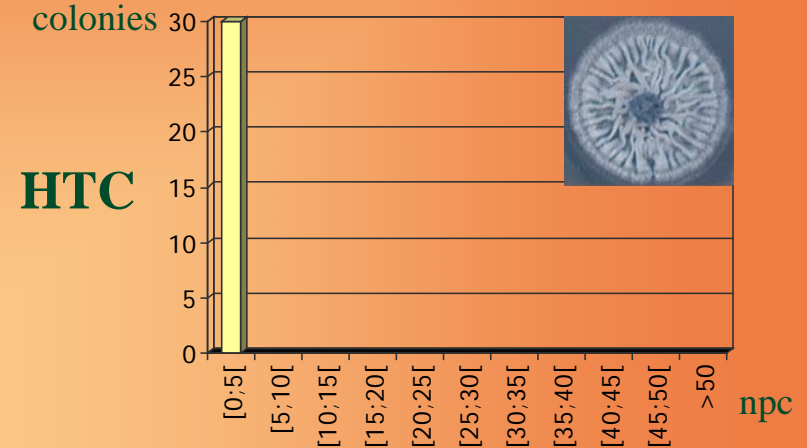
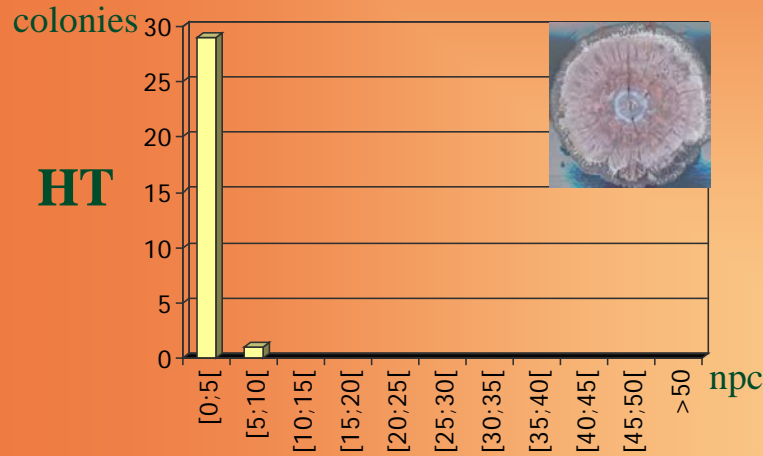
- ↪ Ils sont dépigmentés et non sporulants
- ↪ Ils sont complémentables par introduction du gène *whiG*
- ↪ Le gène *whiG* présente une mutation frameshift pour deux des trois mutants analysés

Lors d'une carence en acides aminés, la réponse stringente est induite

*relA* → ppGpp → régule l'expression génique

La réponse stringente est-elle impliquée dans la production de mutants Pig-pap chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor* ?

# Etude du mutant *relA* M570 de *S. coelicolor*

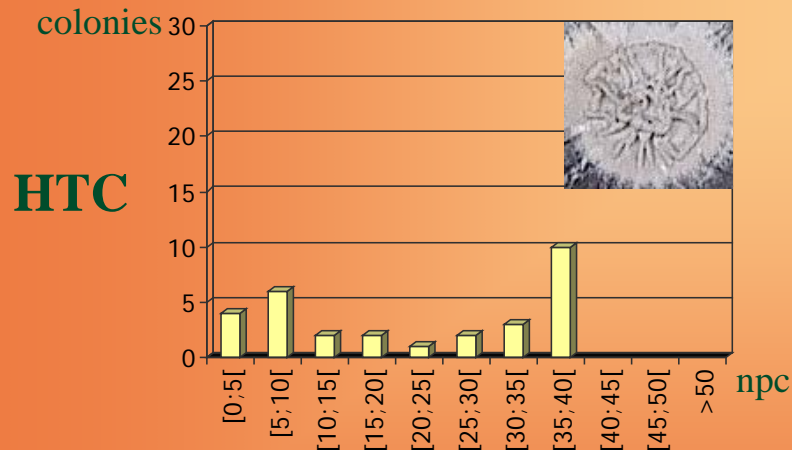


# Complémentation du mutant *relA* M570 par introduction du plasmide pIJ6084

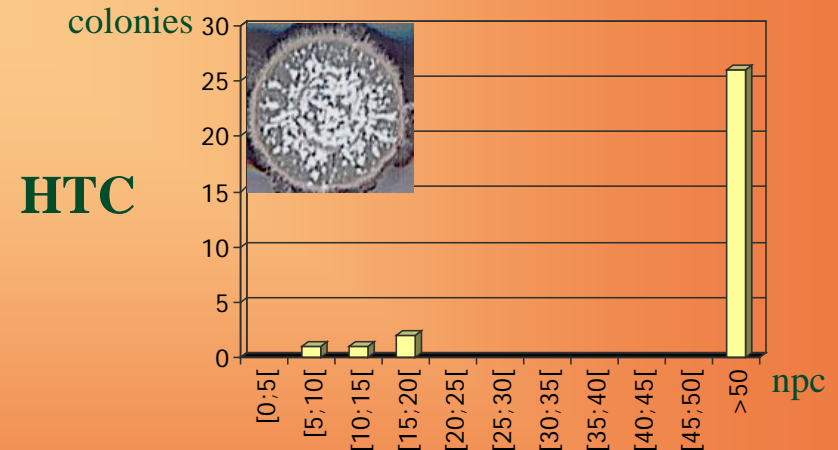
★ Le plasmide pIJ6084 porte la région de *relA* qui présente l'activité ppGpp synthétase sous le contrôle du promoteur *tip* (inductible par le thiostrepton)

★ Induction du promoteur *tip* exprimant la ppGpp synthétase

## Sans induction



## Avec induction

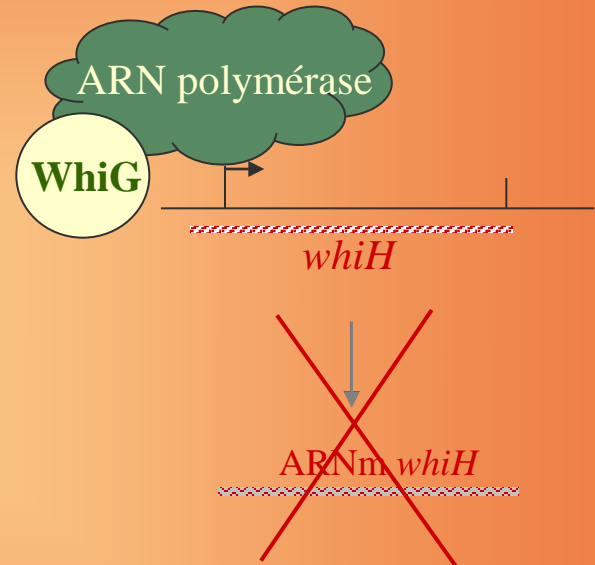
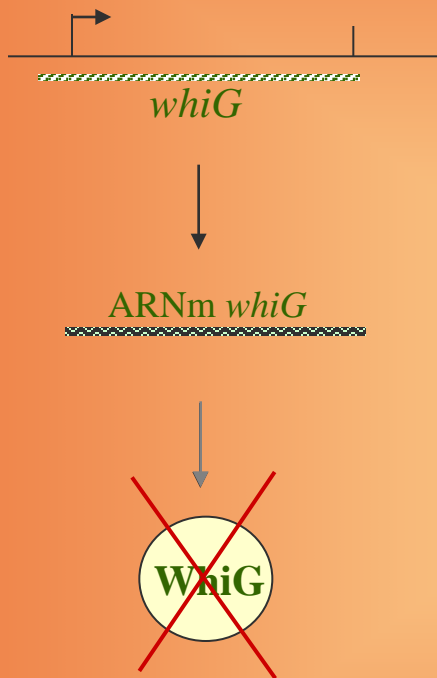


# Relation entre la réponse stringente et la production de mutants Pig-pap chez *Streptomyces*

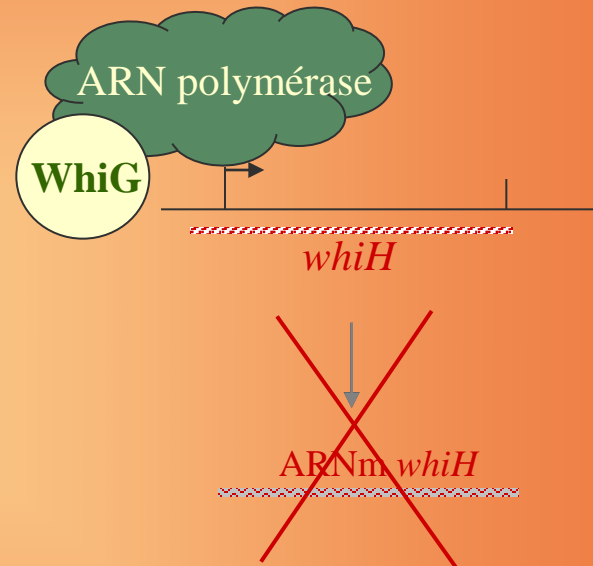
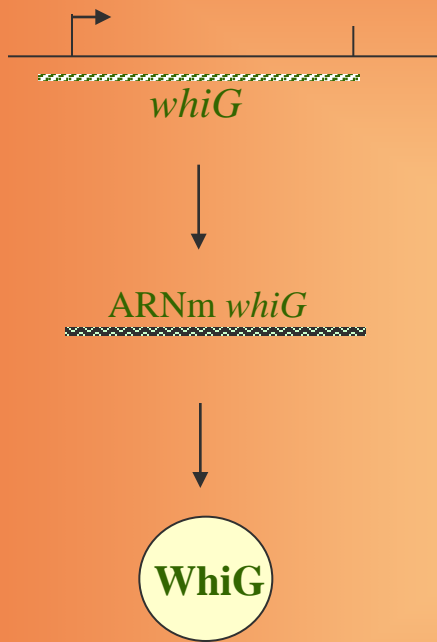


# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

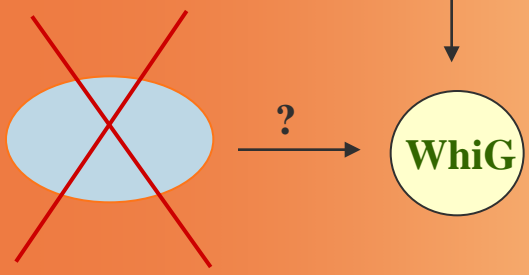
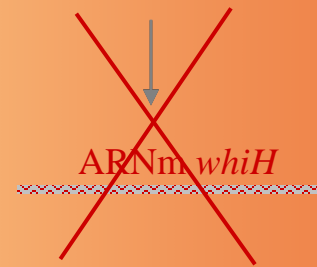
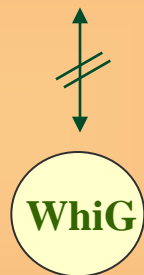
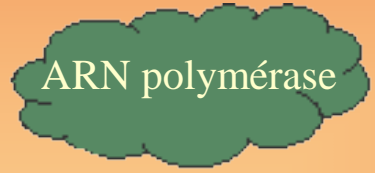
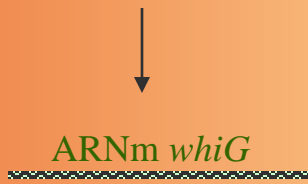
Nature moléculaire des mutants Pig-pap  
chez *Streptomyces* ?



*Discussion et perspectives*

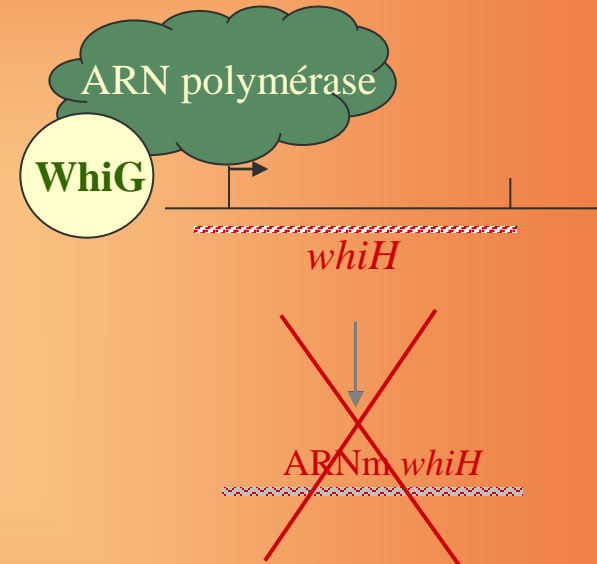
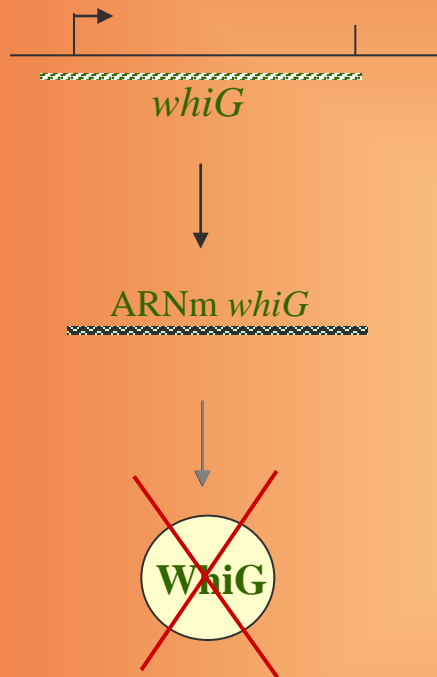


*Discussion et perspectives*



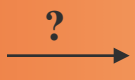
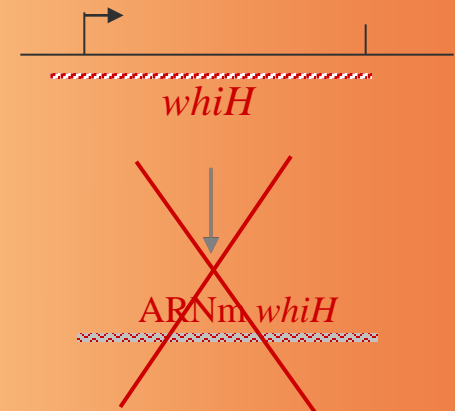
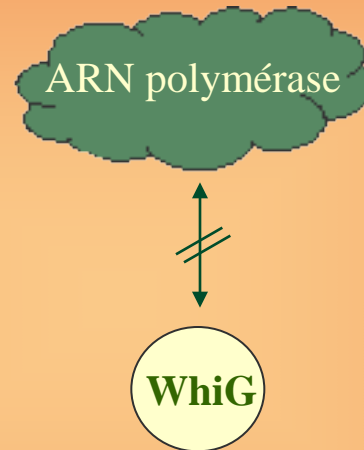
*Discussion et perspectives*

# Modification post-transcriptionnelle du gène *whiG*



*Discussion et perspectives*

# Modification d'un régulateur de WhiG



*Discussion et perspectives*

# Régulation du facteur $\sigma^{\text{WhiG}}$ chez *Streptomyces* ?

Facteur anti-sigma ?

Facteurs anti-sigma et anti-anti-sigma ?

Protéase ?

**Nature de la relation entre production de mutants**

**Pig-pap et réponse stringente ?**



**Passage en phase stationnaire**  
**ou**  
**Limitation en acides aminés**

$\xrightarrow{+}$   
*relA*

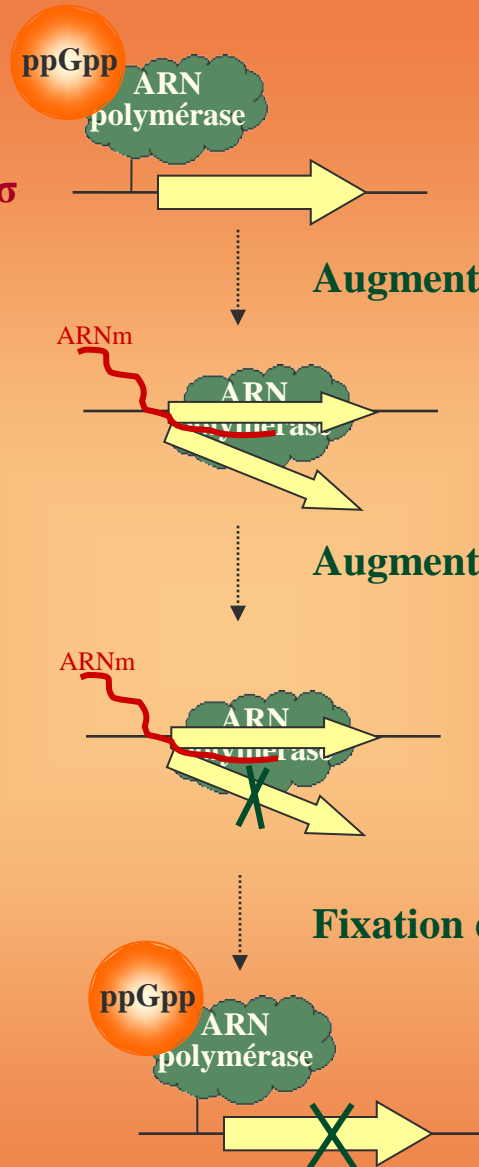


**augmente la transcription de certains gènes**

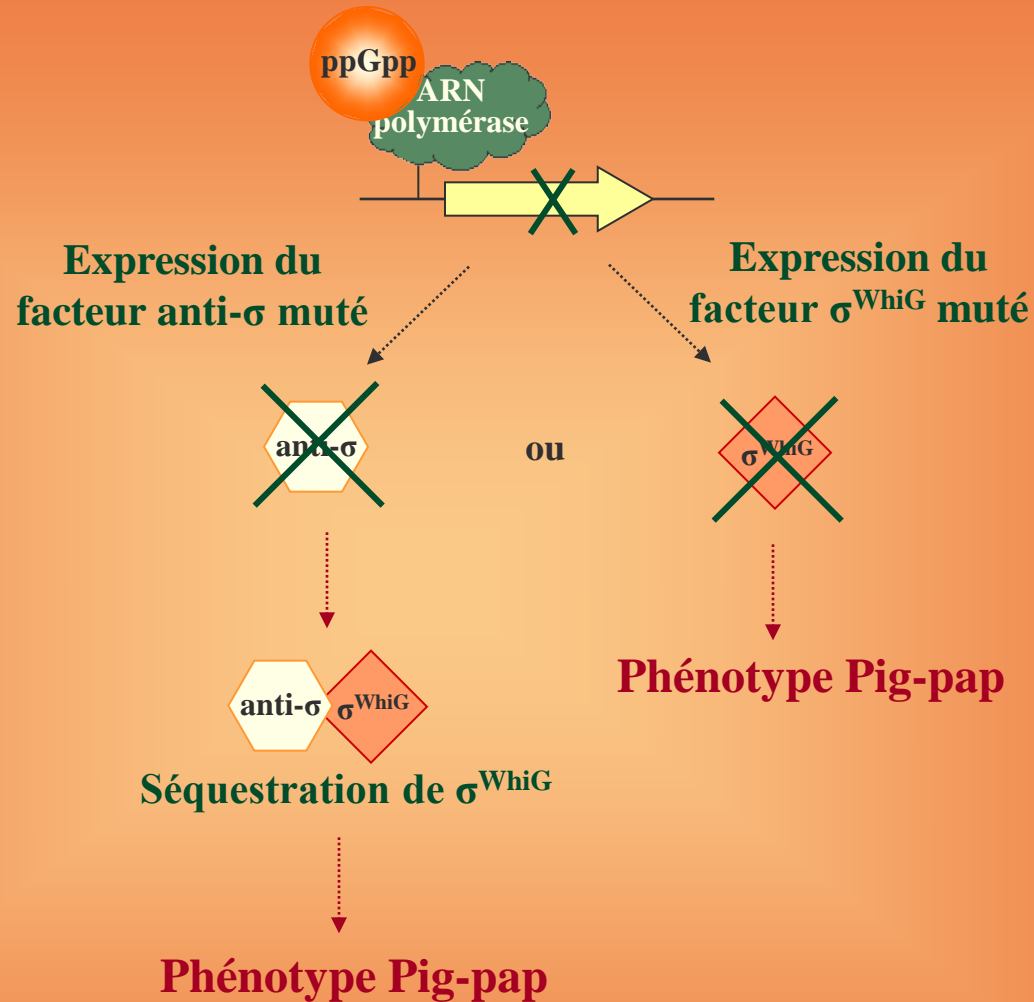


**augmente leur mutabilité**

gène codant :  
- un facteur anti- $\sigma$   
- le facteur  $\sigma^{\text{WhiG}}$



*Discussion et perspectives*



*Discussion et perspectives*

# Rôle des papilles chez *Streptomyces* ?

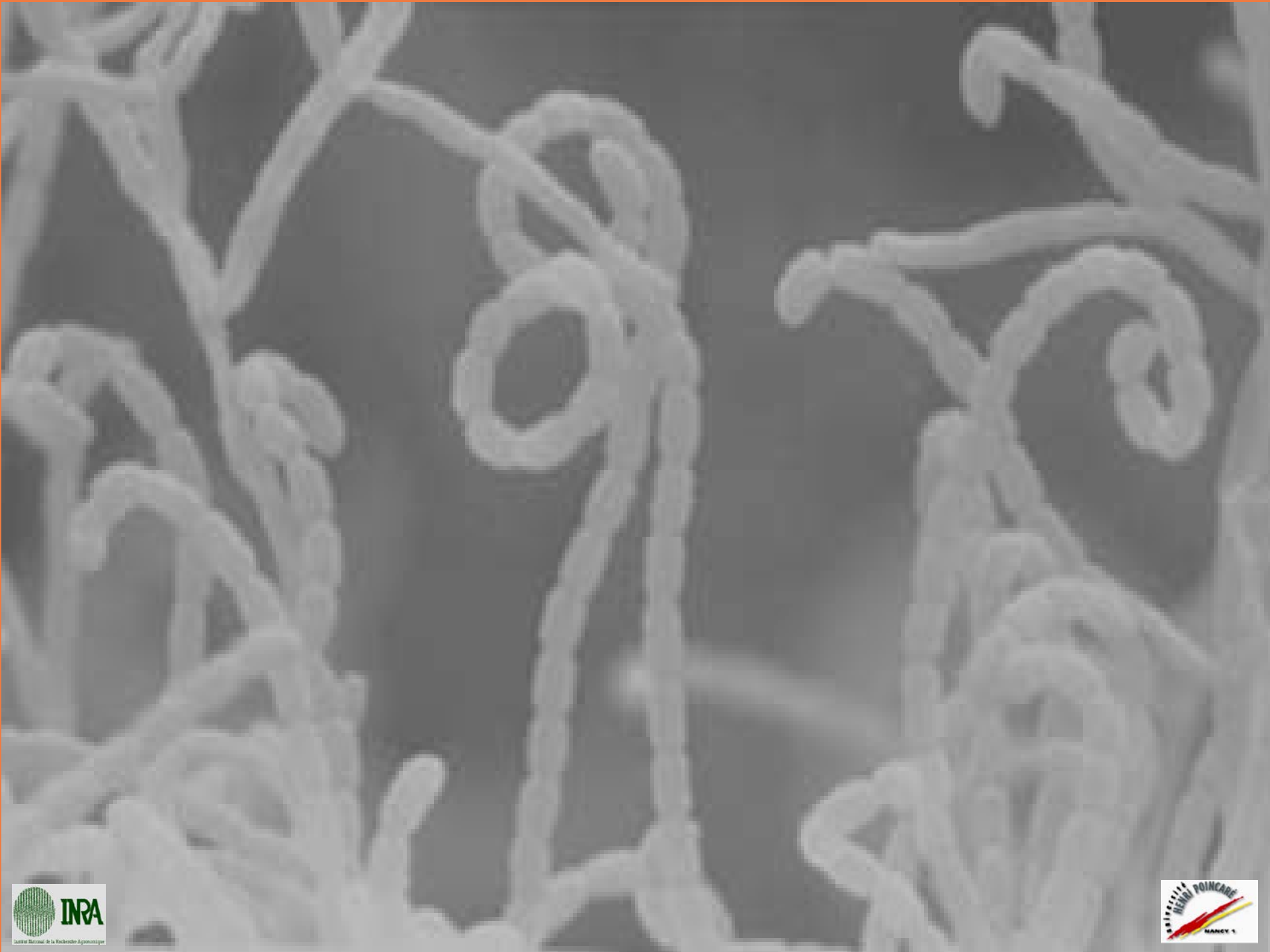
*Conclusion*



**Axelle Andrieux**

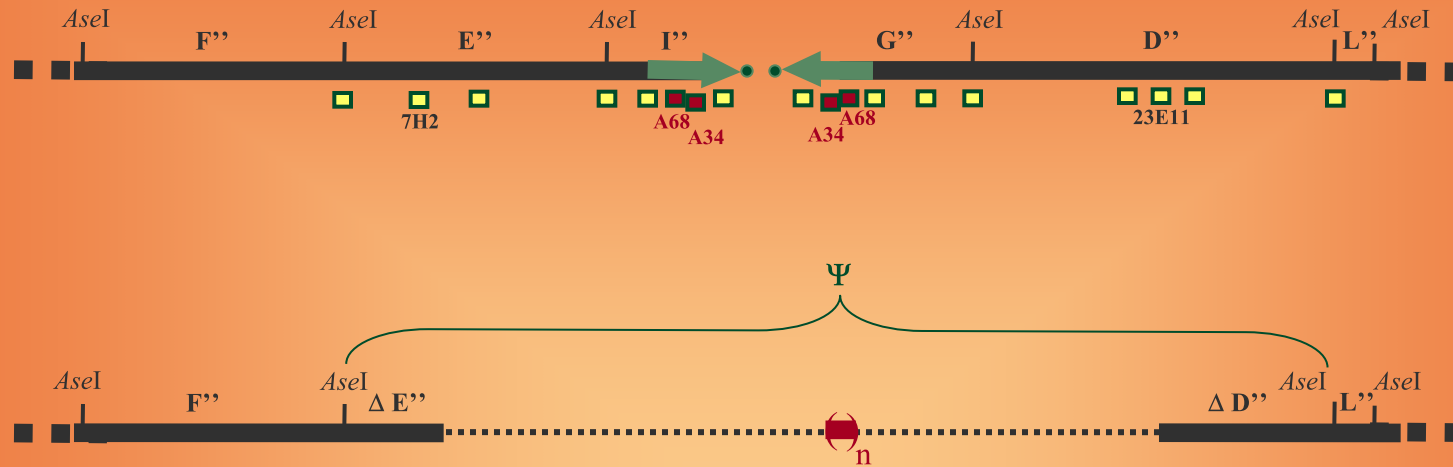


**Magali Genay**



*Bras chromosomique gauche*

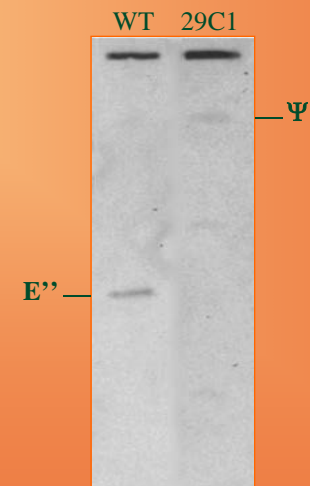
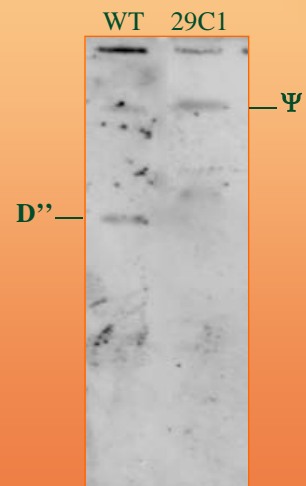
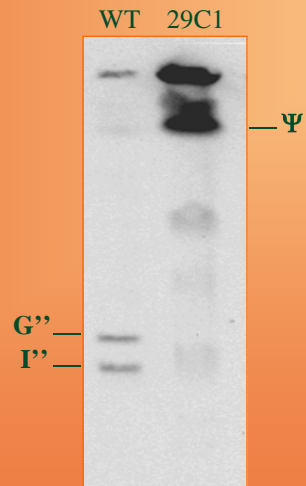
*Bras chromosomique droit*



**A68**

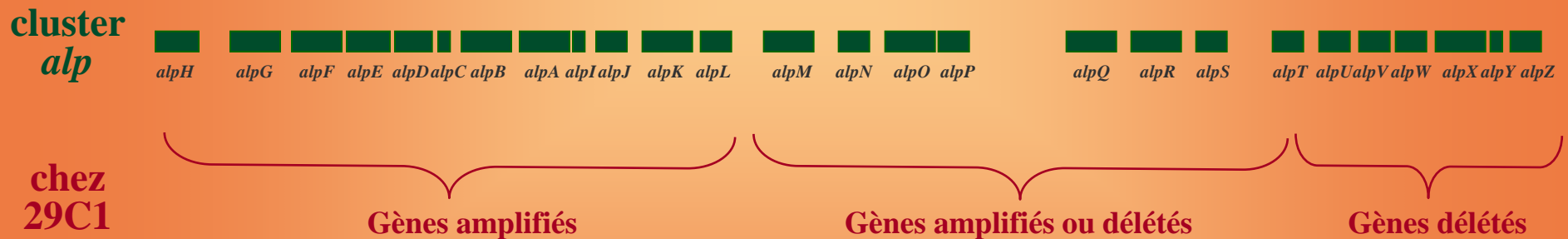
**23E11**

**7H2**

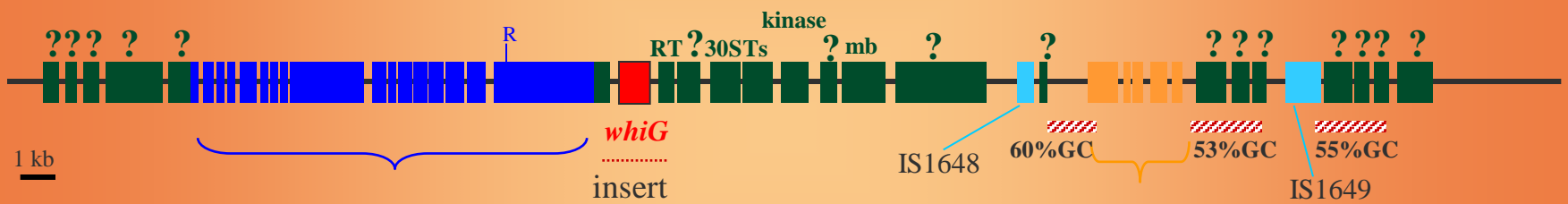


Pang *et al.* .....► Nouvelle polyketide synthase (PKS) au niveau des TIR

### Cluster *alp* pour « angucycline-like polyketide »







prophage  
 Bas %GC (66-68%)  
 12 kb  
 17 ORF  
 1 transposase putative  
 3 régulateurs potentiels  
 13 protéines de fonction inconnue

$\Delta$  pSAM2  
 4 kb  
 5 ORF (96-98% identité)  
 tra  
 2x pra (pseudogène)  
 RT  
 mutT like