



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point de la technique de transformation par électroporation de *Streptomyces griseus* et construction des vecteurs permettant la disruption de gène impliqué dans la biosynthèse de la candicidine

Ergot, Pascal

Award date:
1995

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

0 1 DEC. 1995



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**Mise au point de la technique de transformation par
électroporation de *Streptomyces griseus* et construction des
vecteurs permettant la disruption de gène impliqué dans la
biosynthèse de la candidicine.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

**Ergot Pascal
Décembre 1995**

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

**Mise au point de la technique de transformation par électroporation de
Streptomyces griseus et construction des vecteurs permettant la
disruption de gène impliqué dans la biosynthèse de la candicidine.**

Ergot Pascal

Résumé

Il n'existait pas, jusqu'à présent, de méthode de transformation rapide, simple, efficace et reproductible de *Streptomyces griseus*, bactérie productrice d'antibiotiques, dont la candicidine fait partie. La mise au point de la technique de transformation par électroporation permet d'obtenir un nombre de transformants élevé (10^5 à 10^6 par μg d'ADN) et est facilement reproductible.

D'autre part, la construction de vecteurs plasmidiques suicides chez *S.griseus* et répliquables chez *Escherichia coli* permet, après insertion dans ce vecteur de fragments de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antibiotique candicidine, la disruption de ces mêmes gènes par recombinaison homologue.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : J.Vandenhautte

Co-promoteur : J.-A. Gil (Université de Leon, Espagne)

REMERCIEMENTS

Arrivé au terme de ce travail, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et encouragé durant cette année.

Tout d'abord, je remercie le professeur Gil, de l'université de Leon (Espagne) de m'avoir accueilli dans son département pour la réalisation ce travail. Ce fut une expérience très enrichissante.

Grand merci également à Ana Belen, Dori et Pilar, la gente féminine du labo 193, pour leurs conseils et remarques avisées tout au long de l'année, ainsi que pour la bonne humeur qu'elles font régner dans le département.

Merci également à Robert, Franck, Matthieu, Antonella, Raphaël, Camilla, Maria-Jesus, Isabella, Carmen, mes compagnons européens avec qui j'ai partagé bien des choses ...

Merci à mes lecteurs, qui vont passer du temps à lire, comprendre et évaluer ce travail. Je suis à leur entière disposition pour toute question relative à ce travail.

Merci au Professeur Vandehaute qui, malgré qu'il ne connaissait pas le sujet, est "entré" dans ce travail pour le corriger et m'aider à le présenter correctement.

Merci à toute ma famille et tout mes amis qui m'ont soutenu tout au long de l'année par leurs lettres et coups de téléphone.

And, last but not least, Grand Merci à José Ramon Macias, qui tout au long de cette année ma suivi pas à pas. Je le remercie de m'avoir fait découvrir le monde de *Streptomyces* et des antibiotiques polyènes. Merci également de ces visites inoubliables dans l'Espagne profonde, la vraie, la seule. Merci de m'avoir accueilli dans sa famille pour une découverte sensationnelle: la gastronomie espagnole et les vins espagnols. Et enfin merci pour les magnifiques soirées que nous avons passées ensemble, ce sont des moments que je n'oublierai jamais.

ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
Amp ^r	Marqueur de résistance à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AS	Anthranilate synthetase
ATP	Adénosine triphosphate
bp	Paire de bases
CoA	Coenzyme A
Da	Dalton
dTDP	Deoxythymidine diphosphate
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DTT	Dithiotréitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylènediamine-tétraacétate
EtBr	Bromure d'éthidium
FAS	Fatty Acid Synthetase
g	Gramme
IPTG	Isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB	Milieu de Luria-Bertani
M	Molaire
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
nm	nanomètre
nM	Nanomolaire
OABA	O-aminobenzoic acid
ORF	Phase ouverte de lecture ("Open Reading Frame")
PAAP	p-Amino acétophénone
PABA	p-Aminobenzoic acid
PABS	p-Aminobenzoate synthetase
PEG	Polyéthylèneglycol
PKS	Polykétide synthetase
PM	Poids Moléculaire
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
TDP	Thymidine diphosphate
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultra-Violet
V	Volt
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.

I.1. LE GENRE *Streptomyces*.

- I.1.1. Caractéristiques générales.
- I.1.2. Cycle biologique de *Streptomyces*
- I.1.3. Habitat.
- I.1.4. Le métabolisme de *Streptomyces*.
- I.1.5. La génétique de *Streptomyces*.

I.2. LES ANTIBIOTIQUES.

- I.2.1. Généralités.
- I.2.2. Fonction dans la nature.
- I.2.3. La prévention du "suicide" par les micro-organismes producteurs.

I.3. LES ANTIBIOTIQUES POLYENES.

- I.3.1. Généralités.
- I.3.2. Caractéristiques physico-chimiques des polyènes.
- I.3.3. Mode d'action des polyènes.
- I.3.4. Usage des polyènes.

I.4. LA CANDICIDINE.

- I.4.1. Structure, propriétés physico-chimiques et applications.
- I.4.2. La biosynthèse de la candidicine.
 - I.4.2.1. Biosynthèse du résidu aromatique.
 - I.4.2.1.1. Génétique de la biosynthèse de PABA.
 - I.4.2.1.2. Etudes biochimiques de la PABA synthétase de *S.griseus*.
 - I.4.2.1.3. PABA comme initiateur de la biosynthèse de candidicine.
 - I.4.2.2. Biosynthèse du cycle macrolide aglycone.
 - I.4.2.2.1. Synthétases d'acides gras et polykétides.
 - I.4.2.2.2. Assemblage des polykétides.
 - I.4.2.3. Biosynthèse du sucre aminé.

I.5. REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA CANDICIDINE.

I.5.1. Régulation par les acides aminés aromatiques.

I.5.2. Régulation par le phosphate.

II. OBJECTIFS.

III. MATERIELS ET METHODES.

III.1.MICRO-ORGANISMES UTILISES.

III.2. MILIEUX DE CULTURE.

III.2.1. Milieux de culture pour *Streptomyces*.

III.2.2. Milieux de culture pour *Escherichia coli*.

III.3. SOLUTIONS STOCKS.

III.4. MAINTENANCE DES MICRO-ORGANISMES.

III.4.1. Obtention et conservation des spores de *Streptomyces*.

III.4.2. Conservation des souches de *Escherichia coli*.

III.5. ISOLEMENT DE L'ADN.

III.5.1. Isolement de l'ADN total de *Streptomyces*.

III.5.2. Isolement d'ADN plasmidique de *Streptomyces*.

III.5.3. Isolement d'ADN plasmidique de *Escherichia coli*.

III.5.4. Mesure de la concentration en ADN.

III.5.5. Purification d'ADN récupéré.

III.5.5.1. Précipitation et concentration des protéines.

III.5.5.2. Traitement à la RNase.

III.6. MANIPULATIONS DE L'ADN.

III.6.1. Digestion de l'ADN avec des endonucléases de restriction.

III.6.2. Ligation des molécules d'ADN.

III.7. TRANSFORMATION DE *Escherichia coli*.

III.7.1. Induction de l'état de compétence de *Escherichia coli*.

III.7.2. Transformation avec de l'ADN.

III.8. ELECTROPHORESE DE L'ADN.

III.8.1. Préparation des gels d'agarose.

III.8.2. Détermination des tailles des fragments d'ADN généré par digestion avec des endonucléases de restriction.

III.9. RECUPERATION DE FRAGMENTS D'ADN.

IV. RESULTATS.

IV.1. MISE AU POINT DE L'ELECTROPORATION.

IV.1.1. Contrôles.

IV.1.2. Intensité du courant et longueur du pulse.

IV.1.3. Effet de la concentration en ADN.

IV.1.4. Effet de la dilution et de la sélection des transformants.

IV.1.5. Protocole de haute efficacité pour l'électroporation.

IV.2. CONSTRUCTIONS DES VECTEURS PLASMIDIQUES SUICIDES DE DISRUPTION DE *pab* AB et *pab* L.

IV.2.1. Plasmides parentaux.

IV.2.1.1. pGM7

IV.2.1.2. pBluescript

IV.2.1.3. pULCS 14

IV.2.2. Isolement des fragments internes des gènes *pab* AB et *pab* L.

IV.2.3. Le vecteur plasmidique suicide de disruption de *pab* AB.

IV.2.4. Le vecteur plasmidique suicide de disruption de *pab* L

IV.2.5. Transformation de *Escherichia coli* et contrôle des résultats.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

V.I. CONCLUSION.

V.II. PERSPECTIVES.

VI. BIBLIOGRAPHIE.

I.INTRODUCTION

I.1. LE GENRE *Streptomyces* (Waksman et Henrici, 1943).

Les organismes procaryotiques les plus importants desquels dérivent des produits utiles appartiennent sans aucun doute au genre *Streptomyces*.

I.1.1. Caractéristiques générales.

Le genre *Streptomyces* (137) est un membre de la famille *Streptomycetaceae* dans l'ordre bactérien *Actinomycetales* (14), toujours objet de recherche intensive comme source bactérienne d'agents antimicrobiens depuis le début des années quarante.

Initialement nommé *Actinomyces*, c'est le genre le mieux connu de sa famille en raison de son ample distribution dans la nature, spécialement dans le sol. Le genre *Streptomyces* inclu un grand nombre des plus importants micro-organismes producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires. Dans le *Systemic Bacteriology* (Vol. IV) "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*" (86) 463 noms d'espèces sont répertoriés. Cependant, le nombre d'espèces actuelles de ce genre excède le millier.

Les membres de la famille *Streptomycetaceae* sont des bactéries aérobies sporulantes Gram-positives qui présentent un cycle complet de différenciation morphologique semblable à celui des champignons filamenteux (20,53). Leur croissance est mycélienne avec de larges filaments ramifiés qui rarement se fragmentent donnant, dans quelques cas, une apparence fongique. Le mycélium a normalement 0,5-2,0 mm de grosseur. Les hyphes sont de deux types: aériens et de substrat. Les *Streptomyces* forment des tapis ("mats") de croissance mycéliale en milieu de culture avec agar. Leur température de croissance optimale est de 25-35°C. Ils sont hautement oxydatifs et peuvent être mésophiles, psychrophiles et thermophiles, acidophiles, neutrophiles et alcalophiles, halophiles obligés et pathogènes de l'homme et des animaux.

Les deux caractéristiques habituelles de la famille *Streptomycetaceae* sont a) Substrat mycélien non fragmentable, et b) la transformation des hyphes aériens en chaîne de spores.

C'est l'avènement de la microscopie électronique et le développement des connaissances sur les propriétés fondamentales des micro-organismes qui ont permis de résoudre la controverse sur la nature bactérienne ou champignons filamenteux des *Streptomyces* (81).

Les *Streptomyces* possèdent une ultra structure cellulaire typiquement procaryote de bactéries Gram-positives (143). La paroi cellulaire des streptomycètes consistent en un réseau de peptidoglycanes entrelacés par des sous-unités peptidiques de L-alanine, acide glutamique et acide LL-diaminopimélique unis par des liens de glycine.

Les *Streptomyces* croissent par la formation d'un réseau de ramification d'hyphes multinucléées ("substrat mycélien") qui pénètre et dégrade le matériel organique par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques. La différenciation en spores se passent normalement sur milieux solides pauvre en nutriments. La manifestation la plus apparente de différenciation morphologique est la formation d'un mycélium aérien consistant en hyphes qui poussent vers le haut à partir du substrat mycélien, ce qui donne une apparence veloutée aux colonies. La formation du mycélium aérien est accompagné de la lyse partielle du substrat mycélien. C'est le résultat de cette lyse qui constitue une source de nutriments pour les états de développement ultérieurs (107,140). Les hyphes aériens se cloisonnent pour former de longues chaînes de cellules uni-nucléées, lesquelles, *in fine*, produiront des spores pigmentées qui donnent une couleur spécifique aux colonies de chaque espèce (49,106).

Les *Streptomyces*, selon leur exigence vis-à-vis du pH, se groupent en deux catégories(74). Les acidophiles croissent à un pH compris entre 3,5 et 6,5, avec une valeur optimale voisine de 5,0 (70), alors que les *Streptomyces* neutrophiles croissent depuis pH 5,0 jusqu'à 9,0, avec un pH optimum autour de 7,0. Quelques *Streptomyces* ont été isolés à partir de sols à un pH supérieur à 9,0 (127).

La majorité des *Streptomyces* croissent optimalement dans un ordre de température mésophile (50-60°C), bien que l'on connaisse quelques espèces qui poussent bien au delà, mais il n'est pas clair que ces espèces représentent de véritable thermophiles ou mésophiles thermotolérantes (74).

I.1.2.Cycle biologique de *Streptomyces*.

Les étapes successives qui conduisent à une colonie totalement différenciée suivent une séquence temporelle ordonnée durant plusieurs jours comprenant la formation de deux types de cellules totalement séparées: les cellules du substrat mycélien, qui sont programmées pour subir la lyse, et celles du mycélium aérien, qui subissent la différenciation en spores.

Le cycle commence avec la germination d'une spore, processus durant lequel les processus métaboliques cellulaires au repos vont s'enclencher progressivement (synthèse d'ARN, synthèse de protéines, etc.), en même temps que se dégrade le matériel de réserve préalablement stocké. En approximativement deux heures commence la synthèse d'ADN et la formation du "tube germinal" à partir duquel se développe le "substrat mycélien" comme un réseau complexe de hyphes. Ce substrat mycélien pénètre et solubilise les produits organiques du support dans lequel il croît au moyen de la sécrétion d'une énorme variété d'enzymes hydrolytiques (18).

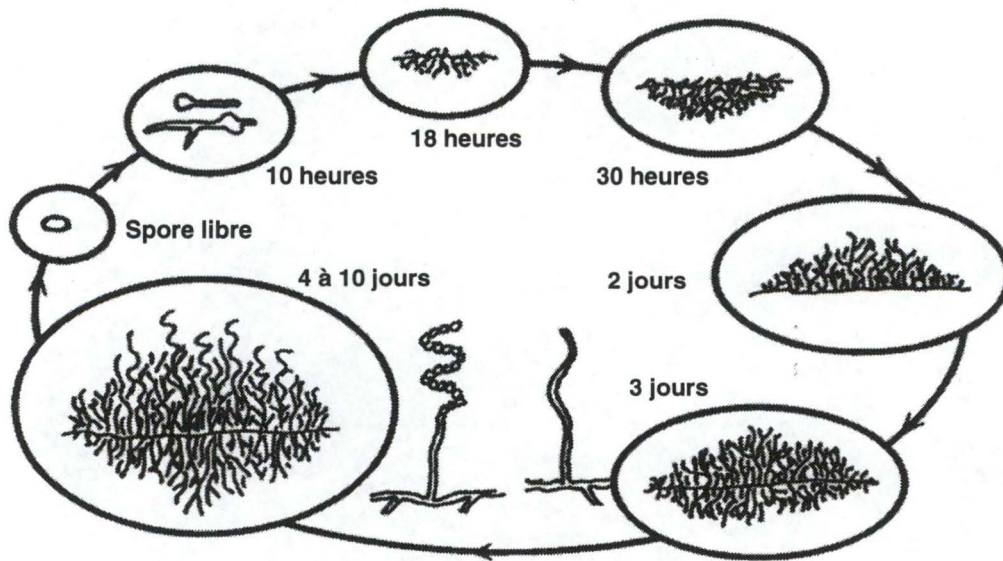


FIGURE I.1 Schéma du cycle biologique de *Streptomyces* (118).

La croissance de la colonie détermine une polarité morphologique dans laquelle se produit un gradient de nutriments depuis le substrat mycélien jusqu'à la région non fixée au support. A un niveau déterminé de carence nutritive, la zone la plus éloignée de la région réceptrice de nutriments reçoit un signal qui déclenche l'expression des gènes impliqués dans la formation du mycélium aérien. On a beaucoup spéculé sur le type de signal qui provoque ce passage et on a tenté de l'associer à des niveaux élevés de nucléotides cycliques et nucléosides polyphosphatés comme le ppGpp, sans écarter le rôle que peuvent jouer certains produits endogènes diffusibles desquels se détache le "facteur A" (19).

Les hyphes aériens se développent en se nourrissant partiellement des produits de la dégradation du substrat mycélien, et une fois formés se courbent, s'enroulent et se subdivisent en compartiments.

Après la division régulière des hyphes aériens, se produit la septation, donnant lieu aux spores, qui sont libérées dans le milieu, fermant ainsi le cycle biologique. Le résultat final est la formation de spores morphologiquement comparables à celles d'autres micro-organismes, bien qu'elles ne paraissent pas thermorésistantes chez *Streptomyces* (FIGURE I.1).

I.1.3. Habitat

Les souches de *Streptomyces* sont amplement distribuées dans la nature (74,81). Cependant, il ne fait aucun doute que le sol est l'habitat naturel de la majorité des membres de la famille des *Streptomycetaceae* (141). Là se trouvent les conditions adéquates pour la croissance et la prolifération. Les streptomycètes sont capables de dégrader certains constituants de résidus de plantes ou animaux peu ou pas exploités par d'autres bactéries ou champignons filamenteux; citons les polysaccharides (amidon, chitine, pectine, et cellulose), des protéines (par ex. kératine, élastine), et, bien que de manière modérée, certains composés aromatiques. Dans le sol, les streptomycètes rencontrent une multitude de supports favorables à leur croissance mycéliale. Par leur cycle de vie spore-mycélium-spore, ils sont aussi adaptés aux autres conditions physiques de leur habitat, telles que l'humidité et l'aération, qui peuvent être soumis à de drastiques changements en une courte période de temps selon le climat et la saison. Bien que les spores de *Streptomyces* ne sont pas aussi résistantes aux

conditions défavorables que le sont les endospores bactériennes, elles contribuent certainement à la survie durant de longues périodes de somnolence, congélation, et autres conditions anaérobies produites par la saturation de l'eau.

Les streptomycètes existent dans le sol sous forme de mycélium ou de spores: la croissance végétative se produit sur des particules organiques (résidus de plantes ou animaux y compris les hyphes de champignons et des protozoaires) et dans la majorité des cas est de courte durée. Le nombre de spores produites par ces micro colonies dépend de la quantité et la de qualité des nutriments fournis; si ils sont peu abondants, le propre tube germinatif d'une spore d'une génération précédente peut se transformer en une hyphe sporogène et produire une courte chaîne de spores.

Les streptomycètes ne sont pas difficiles à cultiver et se satisfont d'une source d'azote inorganique et ne requièrent pas de vitamines ou de facteurs de croissance.

Il est intéressant de signaler que les spores de streptomycètes produites en milieu de culture avec agar et inoculées en terre non stérile ne germent pas ou le font seulement de manière très limitée (105). Cette incapacité à germer peut être due à des effets inhibiteurs d'autres micro-organismes et/ou à la faible abondance de nutriments. Cependant, en terre stérilisée par radiation gamma, les inoculats de spores montrent un taux élevé de germination. De plus, les échantillons de terre stérile et non stérile permettent la croissance de spores préalablement germées.

I.1.4. Le métabolisme de *Streptomyces*.

Le métabolisme de *Streptomyces* est extrêmement versatile et riche, ce qui permet de produire une grande variété de composés. C'est pour eux que l'on a créé les termes "métabolisme primaire" et "métabolisme secondaire". Le métabolisme primaire fait référence aux processus chargés de satisfaire les nécessités biologiques vitales de toutes cellules, comme la synthèse d'ADN, la synthèse de protéines, etc. et le métabolisme secondaire décrit l'ensemble des processus qui donnent lieu à la production des autres composés non impliqués directement dans la maintenance cellulaire de base et sans lesquels l'organisme reste toujours viable: les métabolites secondaires.

Comme exemples de la capacité du genre *Streptomyces* pour produire une grande variété de métabolites secondaires de types distincts, citons la production de plus des 70% des antibiotiques naturels connus (54) en plus d'autres composants tel des antiparasitaires (63), des composés antihelminthiques (128), des agents antiviraux (116) et anti-tumoraux, dont des composés qui inhibent la transcriptase inverse (109), des inhibiteurs des récepteurs b-adrénergiques (68), ou du récepteur de l'EGF (132), des herbicides (123), des produits protéiques comme la pronase de *S.griseus* (142), des amylases (87), des protéases (52), des endonucléases de restriction (50), des nucléases, etc.

La production des métabolites dits secondaires de *Streptomyces* survient toujours au même moment du cycle cellulaire, après la croissance végétative et concomitamment aux changements morphologiques associés (55).

1.1.5 La génétique de *Streptomyces*.

L'étude de la génétique de *Streptomyces* est importante pour trois raisons:

- 1.-Compléter les connaissances sur ce groupe.
- 2.-Permettre son exploitation pour la production de nombreuses molécules d'intérêt.
- 3.-Permettre de l'ingénierie du métabolisme secondaire.

Les *Streptomyces* possèdent un chromosome circulaire avec une distribution caractérisée selon deux orientations divergentes des gènes (55). Les gènes du métabolisme secondaire et nécessaire à la formation du mycélium aérien ont tendance à être concentrés sur un des deux arcs de cercle (122). Les gènes pour la synthèse d'un même antibiotique sont normalement concentrés en grappe ("cluster") (99), ce qui pourrait indiquer que les antibiotiques ne sont pas simples produits finaux résiduels mais bien des substances dont la production représente ou à présenter une nécessité physiologique avantageuse.

L'ADN, comme dans d'autres bactéries, est présent dans les cellules sous forme condensée, en copies multiples par hyphe, mais normalement est en une copie unique dans la spore (57,58).

La caractéristique la plus singulière de l'ADN de *Streptomyces* est le contenu élevé en G+C, approximativement 73% (69-78%) (86), valeur proche de la limite supérieure rencontrée dans la nature (30).

Par analyse de la cinétique de renaturation, la taille du génome de *Streptomyces* est évaluée à $10,5 \times 10^3$ kilobases (kb) (43), et 9.000 kb par expérience d'hybridation (4). Cependant, récemment, par utilisation de l'électrophorèse à alternance de champs magnétique (PFGE), elle a été estimée à approximativement 6.500 kb. Cette taille est de l'ordre de deux fois la taille du génome de *Eschericia coli* (124) ou de *Bacillus subtilis* (145)

Un excès de taille aussi notable par rapport à *E.coli* ne paraît pas être justifiée ni par la présence des gènes impliqués dans la différenciation morphologique ni par la présence des gènes nécessaires à la production des métabolites secondaires. Il semble probable qu'une dizaine de gènes seraient suffisants pour contenir l'information impliquée dans la différenciation morphologique (18,145), et a été estimé que 30-35 kb seraient suffisants pour coder les 15-30 gènes impliqués dans la synthèse d'un antibiotique (55). Ainsi, la bactérie *Bacillus subtilis* possède un cycle biologique complet, est productrice d'antibiotiques et la taille de son génome est similaire à celle de *E.coli*. Une part de l'excès de taille du génome de *Streptomyces* peut s'expliquer par l'existence de zones d'ADN amplifiées constituants des répétitions (250-300 copies) en tandem (119), probablement en majorité non codantes (34).

On a postulé (55) qu'une des raisons possible de la présence de régions non codantes dans le chromosome de *Streptomyces* serait en relation avec les mécanismes de régulation génétique. Des gènes "silencieux" dans des espèces de *Streptomyces* pourraient être exprimés dans des circonstances déterminées (65). Des gènes dupliqués avec la même fonction apparente existent chez *Streptomyces*. Des gènes déterminés de résistance aux antibiotiques pourraient faire partie de ces gènes apparaissant en copies multiples dans la même espèce (131).

En conclusion, l'excès de taille du génome de *Streptomyces* par rapport aux autres procaryotes est un fait qui actuellement n'a pas encore été justifié.

La complexité génétique de *Streptomyces* est encore accrue par la présence de plasmides de tailles et nombre de copies très variable (4-590 kb/1-100 copies). Excepté le plasmide SCP1 qui est porteur des gènes impliqués dans la voie biosynthétique de l'antibiotique méthylénomycine (1), ces plasmides sont en général impliqués dans les processus de conjugaison et fertilité lesquels chez *Streptomyces* ne requièrent le concours que de quelques gènes (59). On ne peut exclure que certains plasmides soient dévolus à d'autres fonctions encore inconnues.

Comme c'est le cas pour les autres procaryotes, les *Streptomyces* possèdent la tendance d'avoir les gènes impliqués dans une même voie biosynthétique ou processus chimique groupés en une même région ou cluster. Cela a été démontré chez *S.coelicor* dans le cas des gènes qui contrôlent le métabolisme du glycérol (121) et en un grand nombre de gènes qui interviennent dans différentes voies biosynthétiques d'antibiotiques (5,92). Cependant, il existe aussi des évidences de situations intermédiaires, où les gènes qui interviennent en une même route biosynthétique sont en partie groupés et en partie dispersés au long du génome, comme c'est le cas de la voie de la biosynthèse de l'histidine, situation qui se rapproche de l'organisation rencontrée chez certains eucaryotes comme les levures (64).

1.2. LES ANTIBIOTIQUES.

1.2.1 Généralités

Le terme antibiotique apparaît pour la première fois en 1928 dans la littérature microbiologique française dédiée à l'antibiosis (15). Cependant, ce terme dans le sens actuel fut introduit par Selman Waksman en 1942, qui le définit comme "une substance chimique dérivée de micro-organismes laquelle possède la capacité d'inhiber la croissance et même de détruire d'autres micro-organismes en solutions diluées". Dans un sens plus ample, les antibiotiques sont des substances d'origines biologiques lesquelles, sans posséder de caractère enzymatique, inhibent en faibles concentrations les processus de croissance cellulaire.

Cet intéressant groupe de molécules connues comme antibiotiques constituent un mélange hétérogène de molécules biologiquement actives avec différentes structures chimiques (16) et des modes d'actions divers (24).

Tout au long de leur histoire, les antibiotiques ont trouvé une application étendue dans le traitement des maladies infectieuses chez l'homme, les animaux, et aussi, bien que de manière plus restreinte, chez les plantes. De plus, quelques uns sont utilisés en nutrition animale et un peu moins dans la conservation des aliments (133). A part de l'importance scientifique et sanitaire des antibiotiques, on peut mesurer leur importance du fait qu'annuellement ils sont produits à raison de 20.000 tonnes dans le monde (26).

Dans les années quarante, tous les antibiotiques commercialisés étaient d'origine naturelle, mais actuellement la majorité sont semi-synthétiques, c'est-à-dire, dérivés d'antibiotiques naturels existants modifiés chimiquement dans le but d'améliorer leurs caractéristiques. Les antibiotiques sont biosynthétisés en cultures discontinues ("batch") de micro-organismes durant ce qu'on appelle l'"idiophase" du développement, phase qui peut être imperceptible mais qui souvent suit la phase de croissance cellulaire ou "trophophase". Les antibiotiques ne possèdent pas de fonction sur la croissance, bien que probablement, comme on le verra plus loin, ils contribuent à la survie de l'organisme producteur particulier dans son environnement naturel. Ils sont produits par certains groupes taxonomiques restreints d'organismes. Ils ne sont pas produit comme des résidus purs mais bien comme un mélange d'isomères, de membres d'une famille chimique étroitement relationnés (139).

Jusqu'à présent on a décrit environ 6.000 antibiotiques d'origine naturelle, et on en découvre toujours à une moyenne de 300-400 par an, mais seulement très peu arrivent à être produits au niveau industriel.

I.2.2. Fonction dans la nature.

La fonctions des antibiotiques dans le métabolisme des micro-organismes producteurs a été sujet de nombreuses spéculations et discussions (25). Parmi les fonctions actuellement rejetées, citons: (1) reliques évolutives ou produits résiduels du métabolisme cellulaire, (2) matériaux nutritifs de réserve, (3) composants de l'enveloppe de la spore, (4) produits de dégradations de macromolécules, (5) implication dans la maintenance de la machinerie biosynthétique de la cellule jusqu'à ce que se produisent les conditions adéquates de croissance, et (6) produits de détoxification. Les fonctions le plus souvent attribuées aux antibiotiques, sont: (1) la capacité de tuer ou inhiber la croissance d'autres organismes dans la nature, offrant ainsi un avantage compétitif à l'espèce productrice (25) et, (2) le rôle dans la différenciation cellulaire, c'est-à-dire dans la transition de cellules végétatives à spores et inversement, bien que l'on ait décrit des mutants non producteurs d'antibiotiques qui peuvent sporuler (27).

Il est hautement probable que tous les antibiotiques ont quelques rôles fonctionnels dans la survie de l'organisme producteur, car il est inconcevable que les séquences de réactions multi-enzymatiques de la biosynthèse d'antibiotique se soient maintenues dans la nature sans aucun effet bénéfique de survie. D'autres activités des antibiotiques incluent phytotoxicité, symbiose avec micro-organismes et plantes et transports de métaux dans les cellules microbiennes (28).

Actuellement les antibiotiques par leur rôle en santé humaine et animale sont utilisés comme outils et jouent un rôle crucial dans le développement de la recherche fondamentale, principalement en biologie moléculaire, biochimie, microbiologie et génétique, y compris l'ingénierie génétique et, à un degré moindre en pharmacologie et chimie organique (35).

1.2.3. La prévention du suicide par les micro-organismes producteurs.

Étant donné que les antibiotiques sont rangés parmi les composés les plus puissants produits par des organismes vivants, il est intéressant de signaler que les souches productrices peuvent rester métaboliquement actives et viables dans leur propre milieu ambiant (23). A côté de cette apparente insensibilité vis-à-vis de la production intracellulaire de l'agent antibiologique, on constate que certaines souches productrices inoculées à un milieu de culture qui contient l'antibiotique qu'elles produisent une inhibition de la croissance. Cependant, tous les antibiotiques produits par micro-organismes ne sont pas actifs face au micro-organisme producteur.

Les micro-organismes croissent et biosynthétisent des métabolites secondaires, tels les antibiotiques, auxquels ils sont sensibles durant leur phase de croissance. Pour cette raison, ces micro-organismes sont programmés pour élaborer leurs produits secondaires seulement après avoir réalisé partie ou tout de cette phase. La formation de l'antibiotique est retardée par le fait que les enzymes spécifiques impliquées dans la production de l'antibiotique sont réprimées ou inhibées durant la phase de croissance.

Le moment de l'initiation de la phase de production varie selon le micro-organisme producteur, depuis la dernière partie de la phase de croissance jusqu'à de nombreuses heures après que la croissance rapide soit terminée.

Bien que les micro-organismes mènent à bien la majeure partie de leurs processus de croissance avant de produire l'antibiotique, ils pourraient, comme nous l'avons vu, être affectés par leur propre antibiotique durant sa production. C'est pourquoi les micro-organismes producteurs développent, durant la phase de production de l'antibiotique, des résistances face à celui-ci.

Les mécanismes de résistance développés par les micro-organismes producteurs ne diffèrent pas fondamentalement de ceux employés par les bactéries résistantes isolées en clinique. Une forme de résistance est due aux modifications de perméabilités membranaires, suivant lesquelles l'antibiotique produit est excrété dans l'espace extra-cellulaire contre un

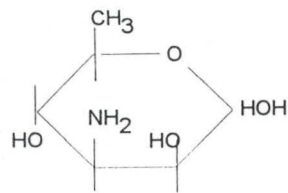
gradient de concentration: il n'y a pas de stockage intra-cellulaire de l'antibiotique synthétisé, celui-ci est immédiatement excrété dans le milieu extérieur où il est donc en plus grande concentration que dans le milieu intra-cellulaire. Une diminution de la perméabilité vers l'intérieur cellulaire durant l'idiophase protège le micro-organisme de l'élévée concentration extra-cellulaire de son propre antibiotique. Il existe d'autres mécanismes de résistance additionnels pour protéger la cellule de l'antibiotique interne qui n'a pas encore été excrété, par exemple, la synthèse d'enzymes qui modifient l'antibiotique le rendant inactif, la modification de la machinerie de l'organisme producteur, tels que les ribosomes, ou par rétro inhibition ("inhibition feedback") ou répression de la production de l'antibiotique.

I.3. LES ANTIBIOTIQUES POLYENES.

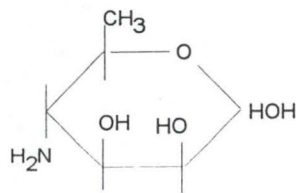
I.3.1. Généralités.

Les antibiotiques polyènes constituent un groupe de nombreux agents antimicrobiens qui appartiennent à la classe des antibiotiques macrolides, comprenant les polyènes et les non-polyènes. Les antibiotiques macrolides sont caractérisés par la possession d'un cycle macrolide, qui est une chaîne de 14 à 38 atomes de carbone fermé par lactonisation (Figure I.3). Les antibiotiques polyènes se différencient des macrolides non-polyènes par la présence de doubles liens conjugués (3 à 7) dans le cycle lactonique, qui est de plus grande taille (26-38 atomes de carbone) que celui des macrolides non polyéniques (14-16 atomes de carbone). Ainsi, le cycle lactonique des polyènes est un chromophore. Quelques polyènes possèdent un ou plusieurs sucres aminés dans leur molécule.(Figure I.2)

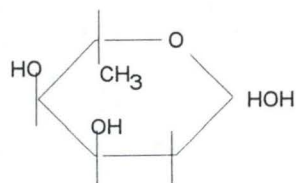
La caractéristique distinctive des antibiotiques polyènes est la présence de trois à sept doubles liens conjugués qui forment part du cycle macrolide et qui est connu sous le nom de chromophore. C'est donc la présence de ce chromophore qui distingue les polyènes et le groupe des macrolides non polyènes. (Figure I.3)



Mycosamine



Perosamine



2,6-Dideoxy-L-ribohexopyranose

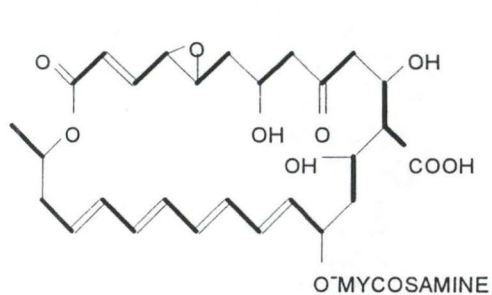
FIGURE I.2 Formule chimique des sucres aminés des macrolides polyènes.

La caractéristique distinctive des antibiotiques polyènes est la présence de trois à sept doubles liens conjugués qui forment part du cycle macrolide et qui est connu sous le nom de chromophore. C'est donc la présence de ce chromophore qui distingue les polyènes et le groupe des macrolides non polyènes. (Figure I.3)

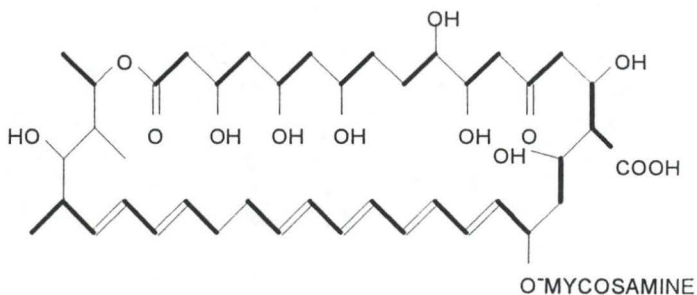
Les polyènes sont actifs contre les levures, moisissures et champignons filamenteux. Ils agissent sur les stérols de la membrane, altérant la perméabilité cellulaire, tandis que les macrolides non polyènes sont actifs contre les bactéries Gram-positives (48).

I.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des polyènes.

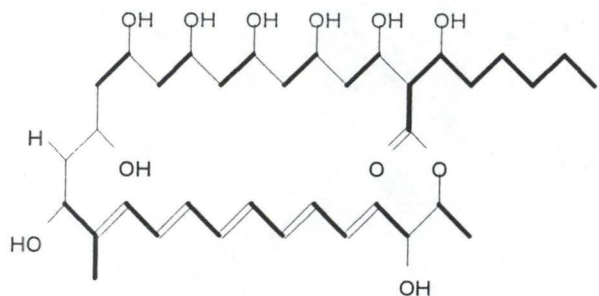
Les macrolides polyéniques ont été classifiés en sous-groupes en fonction du nombre de doubles liens conjugués présents dans le cycle macrolide. Ainsi ils sont classés en triènes, tétraènes, pentaènes, hexaènes et heptaènes selon qu'ils possèdent trois, quatre, cinq, six ou sept doubles liens conjugués respectivement.



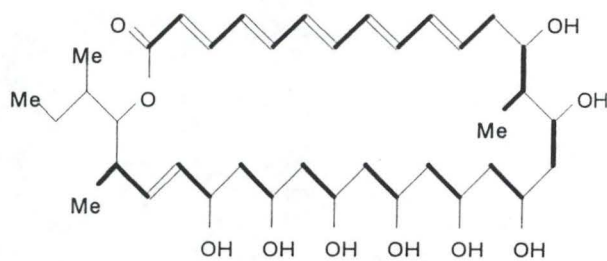
PIRAMICIN



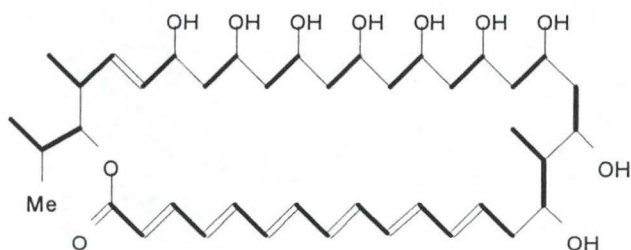
NYSTATIN



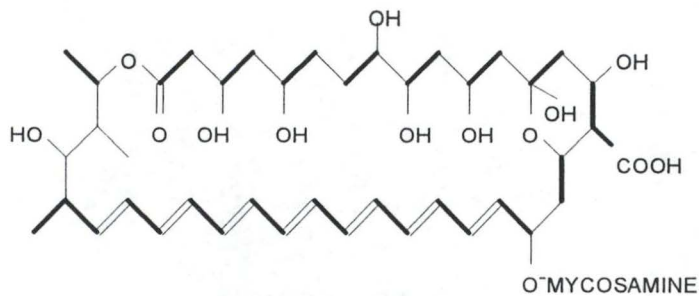
FILIPIN



FAERIFUNGIN



DERMOSTATIN A



AMPHOTERICIN B

FIGURE I.3 Structure chimique de quelques antibiotiques macrolides polyènes.

Ces sous-groupes se caractérisent parfaitement par leurs spectres d'absorption en lumière visible et ultraviolette (280-410 nm). Ces spectres ont trois pics d'absorptions maxima caractéristiques, qui dépendent du nombre de doubles liens conjugués du chromophore. La présence d'un spectre d'absorption typique permet de classer rapidement les polyènes, même à l'état brut des milieux de culture, avant toute extraction avec des solvants organiques.

Le chromophore est le responsable des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques des polyènes. Tous les polyènes sont des composés polyhydroxylés d'un haut poids moléculaire (700-1200); sans point de fusion défini ils se décomposent graduellement avec la chaleur. D'autre part, le cycle macrolide des polyènes est une molécule amphipatique qui contient une portion lipophile rigide (le chromophore) et une portion hydrophile polyhydroxylée flexible.

Une autre caractéristique particulière de la structure de quelques polyènes, concrètement des heptaènes, est la présence d'un composé aromatique qui est uni covalamment via une chaîne aliphatique au carbone qui forme le lien lactonique (146). Les fragments aromatiques composant la molécule des heptaènes sont la p-aminoacétophénone et la N-méthyl-p-aminoacétophénone. (Figure I.4)

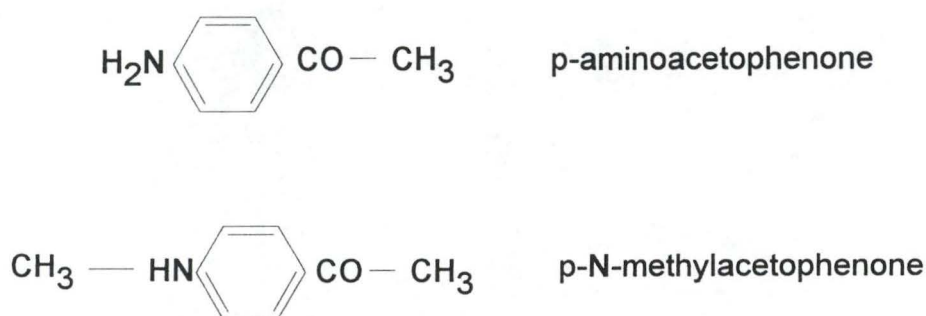


FIGURE I.4 Structures des résidus aromatiques présents dans les antibiotiques macrolides polyènes

Toutes les évidences indiquent que les structures chimiques des polyènes qui leur confèrent la toxicité sont aussi responsables de leurs activités antimycotiques, puisqu'il a été observé que toute modification chimique qui réduit la toxicité réduit aussi l'activité biologique (73).

I.3.3. Mode d'action des polyènes.

Tous les antibiotiques polyéniques sont essentiellement des agents antifongiques, au contraire des macrolides non polyéniques qui sont antibactériens. Kinsky (71) et Lampen et coll. (77) ont établi que la susceptibilité des organismes aux polyènes est due à l'union de l'antibiotique avec les stérols de la membrane. De cette façon, les polyènes sont seulement actifs contre des micro-organismes qui possèdent des stérols dans leur membrane (organismes eucaryotiques). Les polyènes inhibent la croissance des levures, champignons pathogènes, dermatophytes, algues (75), protozoaires, érythrocytes de mammifères (72), mycoplasmes qui requièrent des stérols pour croître (76), mais n'ont pas d'effet sur les mycoplasmes qui ne nécessitent pas de stérols pour leur croissance (32).

La fonction des stérols dans la membrane est une question toujours discutée. La plus acceptée est que la structure plane et étendue des stérols donne une résistance mécanique à la membrane en alignant les phospholipides et les protéines. Si c'est le cas, la combinaison de l'antibiotique avec les stérols peut causer distorsion et mauvais fonctionnement de la membrane, produisant des altérations de la perméabilité sélective (147). Selon la théorie chémosmotique de Mitchell, l'action des polyènes peut se comprendre comme due à une distorsion du gradient électrochimique de protons, les cellules traitées avec des polyènes montrant une perméabilité élevée peut être due à la formation de pores hydrophiles (33).

L'utilisation de techniques fluorimétriques a démontré clairement l'union polyène-stérols (120). D'autre part, l'addition de stérols protège les cellules sensibles aux polyènes, du fait que les stérols additionnés forment un complexe avec les polyènes et réduisent leur concentration effective (45).

I.3.4 Usage des polyènes.

Très peu de polyènes ont été utilisés cliniquement à cause de leur néphrotoxicité (46) et de leur fort pouvoir hémolytique (71). A cause de leur faible solubilité dans l'eau, ils ont été utilisés seulement dans le traitement d'infections topiques et gastro-intestinales. Ils ont aussi été utilisés avec peu de succès dans le traitement de candidiase, histoplasmose, cryptococcose, blastomycose et méningite à cryptococcides (3). D'autres applications pratiques des polyènes ont été: en agriculture, comme agents phytopathogènes et protecteurs de fruits (130), et en recherche pour l'enrichissement de mutants nutritionnels de levures (108).

Traditionnellement les antibiotiques macrolides polyéniques ont été utilisés dans le traitement de mycoses externes, sous-cutanées et systémiques chez l'animal et chez l'homme. Par leur action sur la perméabilité des membranes, quelques polyènes augmentent l'effet d'autres drogues (9), spécialement en cultures cellulaires et microbiennes.

I.4. LA CANDICIDINE.

I.4.1 Structure, propriétés physico-chimiques et applications.

La candicidine est un antibiotique macrolide polyène avec sept doubles liens conjugués (=heptaène) produit par *Streptomyces griseus* IMRU 3570 et a été originellement décrit par Lechevalier et col. (79). De même que beaucoup d'autres antibiotiques, la candicidine est produite comme une famille de composés structurellement très apparentés dont la candicidine-D est la composante majoritaire.

La candicidine pure se présente comme de petite aiguilles ou rosettes de couleur jaune. Elle présente des maxima d'absorption à 403, 380, et 360 nm (Figure I.5). Elle est pratiquement insoluble dans l'eau, alcools, cétones, esters, éthers, hydrocarbures et autres solvants lipophiles. Elle est soluble dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMF) et acides aliphatiques faibles. Elle est très soluble dans une solution aqueuse de tétrahydrofurane à 80%. L'addition de 5-25% d'eau aux alcools augmente considérablement sa solubilité. Elle forme des sels solubles en solutions alcalines.

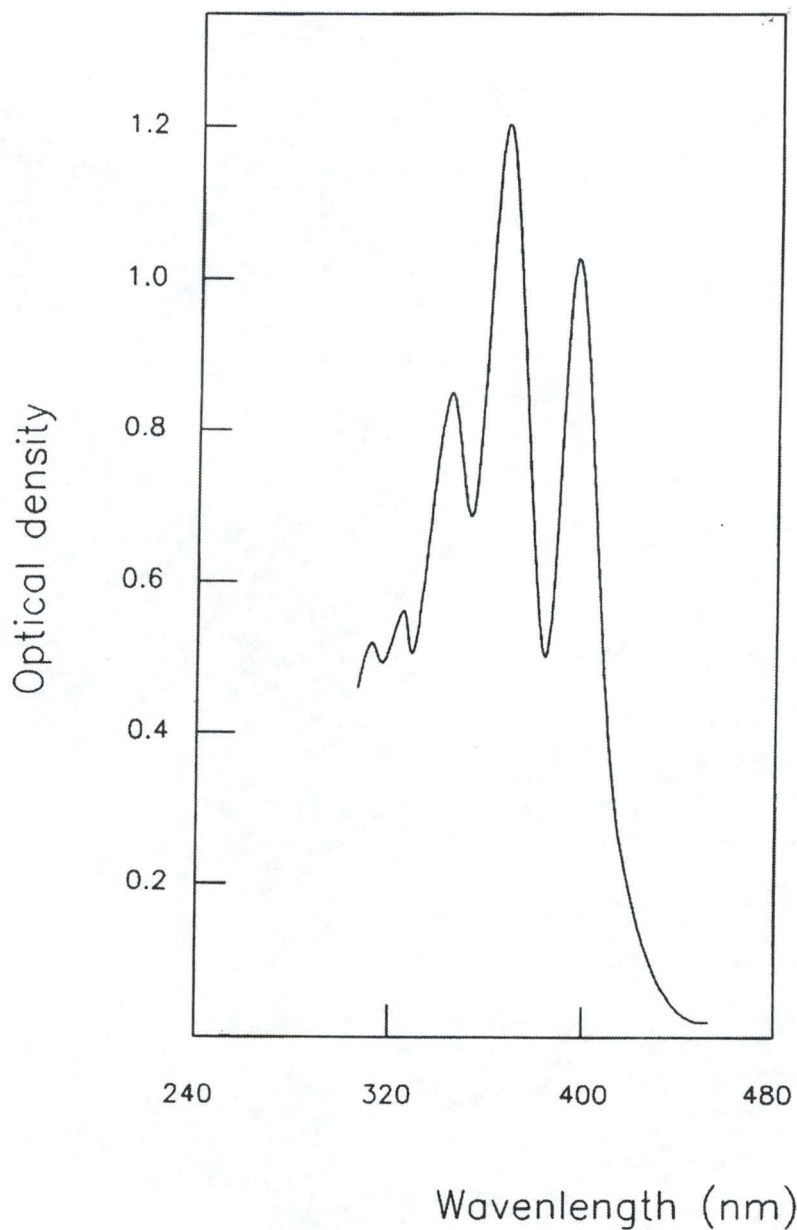


FIGURE I.5 Spectre d'absorption de la candicidine

Les études structurales préliminaires sur la molécule de candicidine furent réalisées par Waksman et col. (138) qui conclurent que, en plus du cycle macrolide à sept doubles liens conjugués, elle possède un fragment aromatique, la p-aminoacetophénone, et un sucre aminé rare, la micosamine (3-amino-3,6-didéoxy-D-manopyranose).

La purification de la candicidine est difficile en raison de l'instabilité de la molécule (51), et pour cela la détermination de la structure chimique ne fut pas obtenue avant l'année 1979 quand Zielinski et coll. (146) proposèrent la structure représentée en FIGURE I.6 pour la molécule de candicidine-D.

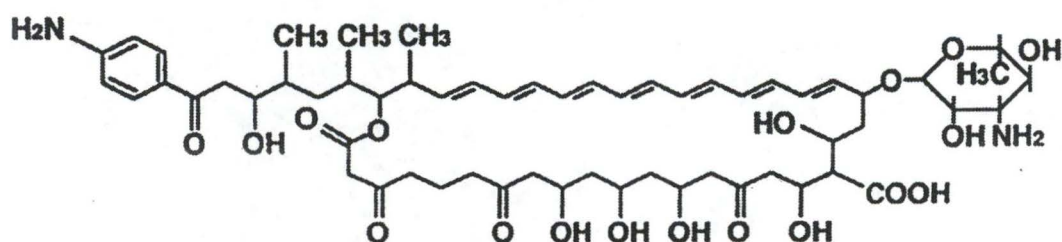


FIGURE I.6. Formule structurale proposée pour la candicidine-D (146).

Comme il a été indiqué antérieurement, les macrolides polyéniques sont des antibiotiques antifongiques hautement actifs (48) dont la candicidine est l'un des plus puissants du groupe, et tire son nom de l'effet inhibiteur marqué qu'elle exerce sur les levures, spécialement celles des genres *Candida* et *Saccharomyces*. Elle est aussi active contre des protozoaires et quelques champignons filamenteux, y compris une variété de champignons pathogènes de plantes.

La candicidine a été utilisée dans le traitement de la moniliasse vaginale (vulvovaginite) (138). Schaffner et Mechlinsky (117) rapportent que la candicidine et autres polyènes affectent profondément le métabolisme du cholestérol des animaux, réduisant le niveau de cholestérol dans le sérum, probablement dû à l'effet de l'union de l'antibiotique avec les stérols du tractus intestinal et l'élimination résultante du complexe dans les fèces. Se basant sur ces résultats, Orkin (110) a utilisé la candicidine dans le traitement de l'hypertrophie prostatique bénigne chez l'homme, et Gordon et Schaffner (1968) l'ont utilisée dans le traitement de l'hyperplasie prostatique canine.

Dû à cet effet anticholestérolémique des polyènes, on a commencé à les utiliser en médecine pour traiter l'artériosclérose. En général, les antibiotiques polyènes sont très insolubles et pour cela, le développement de dérivés solubles avec activité *in vitro* comparable aux composés dont ils dérivent, ouvre de nouvelles possibilités d'utilisations de ce type d'antibiotiques en thérapie humaine (69,117), bien qu'elles soient très limitées du fait de leur néphrotoxicité et de leur action sur les globules rouges.

I.4.2. La biosynthèse de la candicidine.

Les trois différents résidus des macrolides polyènes, le cycle macrolide, le résidu aromatique et le sucre aminé, sont synthétisés par trois voies différentes (94). Les résultats préliminaires obtenus dans le cas de la candicidine indiquent que les gènes impliqués dans les biosynthèses du résidu aromatique et du cycle macrolide sont groupés en cluster (voir plus loin).

I.4.2.1. Biosynthèse du résidu aromatique.

Les résidus p-aminoacétophénone et N-méthyl-p-acétophénone des macrolides polyènes (heptaènes) sont synthétisés à partir du glucose à travers la voie des résidus aromatiques. L'acide p-aminobenzoïque (PABA) a été identifié comme le précurseur immédiat du résidu aromatique de la candicidine par incorporation de [cycle $UL^{14}C$]PABA et [7- ^{14}C]PABA (84,98). Sur base d'études biosynthétiques de plusieurs produits dérivés de polykétides avec résidus aromatiques il apparaît que le cycle aromatique est utilisé comme primer dans la formation des polykétides. Light (82) décrit plusieurs exemples dans lesquels une unité aromatique cinnamoyl de départ produit plusieurs composés des séries chalcone ou stilbène par addition de malonyl-CoA ou de p-coumarate comme intermédiaire dans la biosynthèse de métabolites secondaires polykétides de plantes, comme les flavonoïdes. Un autre exemple d'un résidu aromatique jouant comme initiateur de la synthèse d'antibiotiques aromatiques est le C7N (acide-3-amino-5-hydroxybenzoïque, un intermédiaire de la voie du shikimate) impliqué dans la biosynthèse de l'antibiotique macrolactame rifamycine (36).

L'acide chorismique sert de point de branchement intermédiaire dans la biosynthèse de beaucoup d'importants produits aromatiques. Ces métabolites incluent l'antranilate (nécessaire pour le produit final tryptophane), préphénate (pour la tyrosine et la phénylalanine), PABA (pour l'acide folique et les polyènes aromatiques), isochorismate (pour l'entérochéline et la ménaquinone) et le p-hydroxybenzoate (pour l'ubiquinone) (47). (Figure I.7)

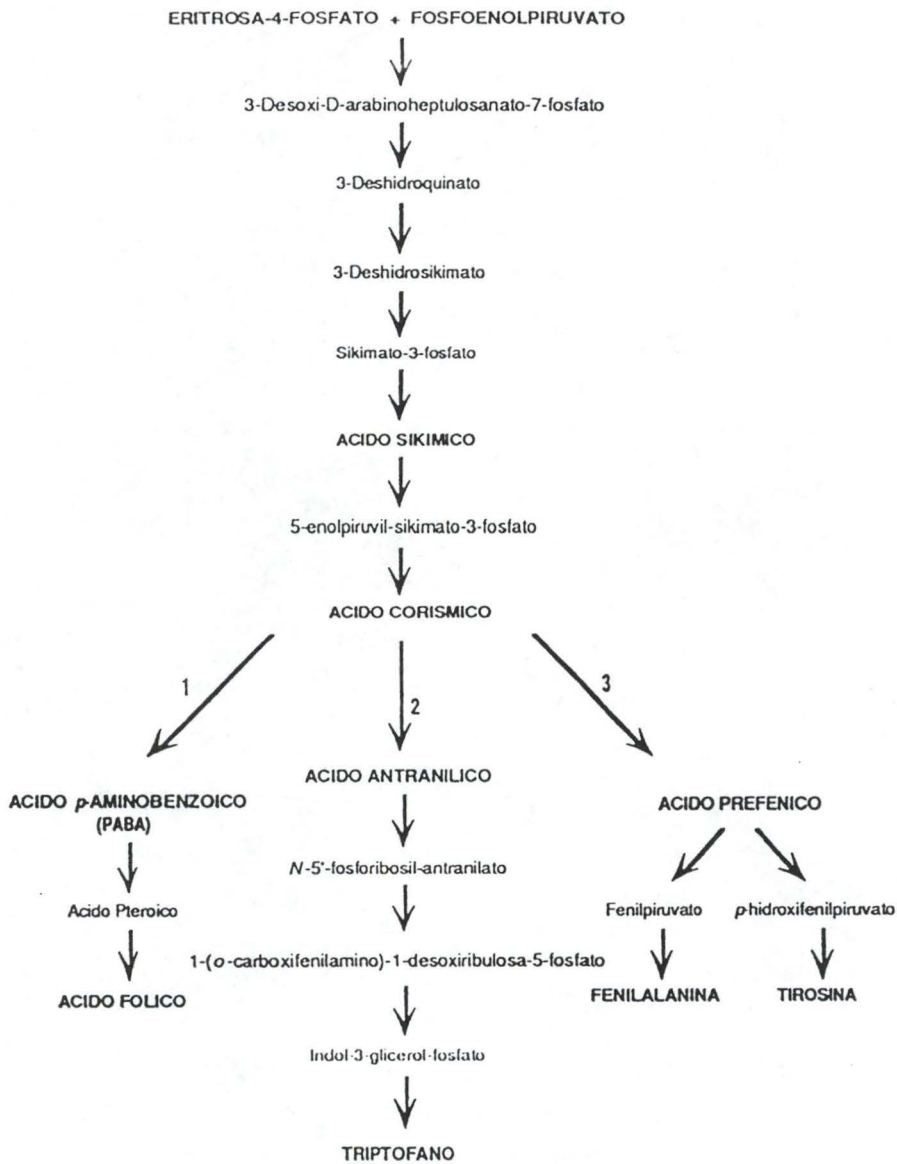


FIGURE I.7 Routes biosynthétiques de l'acide folique et des acides aminés aromatiques: (1) PABA synthétase, (2) Anthranilate synthétase et (3) Chorismate mutase.

Les réactions catalysées par la PABA synthétase et l'anthranilate synthétase (o-aminobenzoate, OABA) sont fortement similaires (Figure 1.8). Chez *E.coli* chaque enzyme est composée de sous-unités non identiques. Les composants I (PM=50.000) de la PABA synthétase et de l'OABA synthétase sont les produits des gènes *pab B* et *trp E* respectivement; les composants II (PM=20.000) de chaque enzyme sont le produit de *pab A* et *trp G(D)*. Les composants I (liant le chorismate) et II (liant la glutamine) des PABA ou OABA synthétases convertissent l'acide chorismique en PABA ou OABA, respectivement, en présence de glutamine (activité aminotransférase) (Fig 1.8). Dans chaque complexe enzymatique le composant I peut fonctionner indépendamment, donnant une haute concentration en ammonium et un haut pH (activité aminase). Cette situation est rencontrée chez *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Neurospora crassa* et *Bacillus subtilis* (5,38,62,66).

1.4.2.1.1. Génétique de la biosynthèse de PABA.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de PABA et OABA ont été clonés; les séquences révèlent des similarités entre *Pab B* et *Trp E*, et entre *Pab A* et *Trp G*, ce qui suggère un ancêtre commun à chacune des enzymes (44,67).

Teng et col. (129) ont montré que l'acide 4-amino-4-deoxychorismique est un intermédiaire clé dans la biosynthèse de PABA et plus tard, il a été découvert que chez *E.coli* et *Bacillus subtilis* trois gènes sont impliqués dans la biosynthèse de PABA alors que deux sont requis pour la biosynthèse de OABA. Le troisième gène impliqué dans la biosynthèse de PABA, nommé *pabC*, code pour une aminodéoxychorismate liase (MM=25.000) et apparemment réalise la réaction finale d'aromatisation (Figure 1.8).

Une autre différence surprenante entre ces gènes chez *E.coli* est que les gènes impliqués dans la biosynthèse de OABA, *trp E* et *trp G(D)*, sont regroupés en un simple opéron hautement régulé à la minute 27 du chromosome, alors que les gènes impliqués dans la biosynthèse de PABA sont séparés sur le chromosome: *pab A* (min. 74), *pab B* (min. 40) et *pab C* (min. 25).

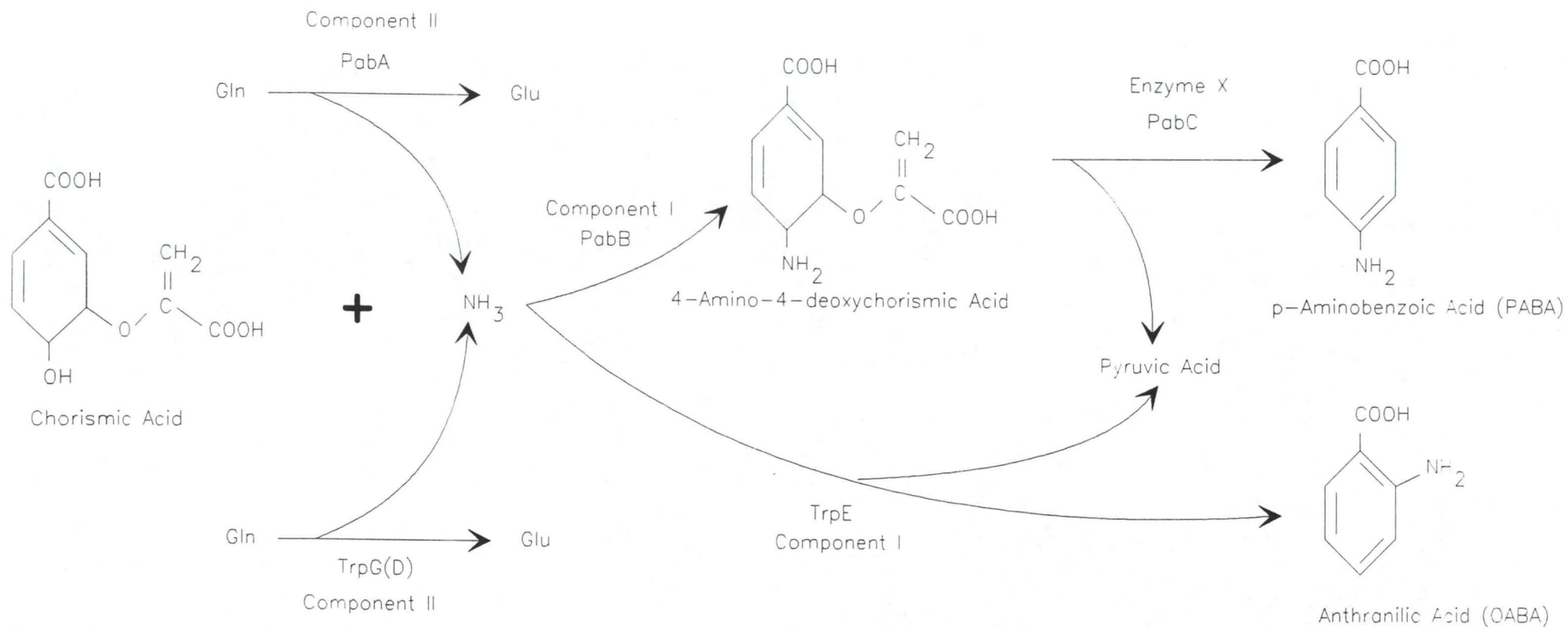


FIGURE I.8 Biosynthèse de PABA et OABA chez *Escherichia coli*.

Le gène de *S.griseus* (*pab S*) pour la PABA synthétase a été cloné dans un fragment *Bam* HI de 4,5 kb par complémentation d'un mutant *pab* de *S.lividans* (JG10) voyant sa résistance à la sulfanilamide restaurée et a été un des premiers gènes impliqués dans la synthèse d'antibiotiques cloné chez *Streptomyces*. Le gène est exprimé chez différentes espèces de *Streptomyces* mais pas chez *E.coli* (40). L'expression est obtenue par transformation chez *E.coli* après délétion *in vivo* naturelle de 1 kb d'ADN en avant du gène *pab*. Le fragment résultant de 3,5 kb peut compléter les mutations de chaque loci *pab A* et *pab B* de *E.coli*. La base moléculaire de la délétion a été élucidée plus tard (22) mais n'est pas expliquée car non nécessaire à ce travail.

Le gène *pab* de *S.lividans* a été cloné par complémentation de *S.lividans* JG10 dans un fragment *Bam* HI:*Sst* I d'ADN de 2,7 kb et complémeantant les mutations *pab A* et *pab B* de *E.coli* (6).

Le gène *pab* du producteur de candidicine *S.griseus* code pour une protéine avec deux domaines: un domaine PabA à l'extrémité aminée et un domaine PabB carboxy-terminal. Le gène contient une ORF de 2171 nt codant pour une protéine de 723 aa (22). Une structure similaire du gène *pab* a été trouvée chez *Saccharomyces cerevisiae* où un fragment d'ADN de 3840 bp du chromosome XIV contient une ORF de 2199 bp codant une protéine de 733 acides aminés (29). Il est très intéressant de remarquer que le gène *pab AB* de la synthèse de la candidicine présent dans *S.griseus* présente plus de similarité avec le gène *pab* de *S.cerevisiae* qu'avec les premiers gènes de la biosynthèse de PABA chez *S.lividans*. Le gène *pab* de *S.lividans* est organisé comme ceux de la première voie de PABA chez *B.subtilis* (*pab B* en aval de *pab A*). Ni *S.griseus* ni *S.lividans* n'ont une ORF correspondante au gène *pab C* dans la région proche de *pab AB* (*S.griseus*) ou *pab B-pab A* (*S.lividans*).

Le séquençage des gènes *pab* chez *S.griseus* et *S.lividans* révèle une organisation différente des gènes *pab A* et *pab B*, indiquant l'existence chez les streptomycètes de deux sets de gènes dirigeant la biosynthèse de PABA, un pour le métabolisme primaire et un pour le secondaire (39). De même, les gènes codant pour les deux anthranylates synthétases, une pour le métabolisme primaire et une pour le secondaire (impliquée dans la synthèse de pyocyanine), ont été clonés chez *Pseudomonas aeruginosa* (31).

Le gène *pab* AB de *S.griseus* IMRU 3570 a été utilisé comme sonde pour trouver de nouveaux polyènes aromatiques produits par des souches de *Streptomyces*. Le gène *pab* s'hybride avec 6 des 16 souches de *Streptomyces*, et ces souches qui s'hybrident se sont révélées être productrices de polyènes aromatiques (39). Le gène *pab* AB a aussi été utilisé comme sonde pour isoler les gènes impliqués dans la biosynthèse de candicidine aglycone (voir plus loin).

I.4.2.1.2. Études biochimiques de la PABA synthétase de *S.griseus*.

La PABA synthétase de *S.griseus* IMRU 3570, le producteur de candicidine, est étudiée dans le laboratoire où ce travail a été réalisé (42). Cette enzyme utilise la glutamine ou l'ammonium comme donneur de groupe amine pour la formation de PABA et est formée chez *S.griseus* seulement durant la phase de production d'antibiotique; l'enzyme est aussi synthétisée durant la phase de production de *Streptomyces coelicor* var. *aminophilus*, producteur de l'antibiotique macrolide polyène fongimycine, contenant du N-méthyl-PAAP. Aucun niveau détectable de cette enzyme n'est trouvé dans des extraits de cellules de mutants de *S.griseus* non-producteurs obtenus par mutagenèse UV, ni dans des extraits de plusieurs autres *Streptomyces* qui ne produisent pas d'antibiotiques macrolides polyènes, suggérant que cette enzyme est directement impliquée dans la production de candicidine (42).

L'activité amidotransférase de la PABA synthétase a été partiellement purifiée par DEAE Biogel et filtrations Sephacryl S-200. Le poids moléculaire estimé de la PABA synthétase de *S.griseus* ou de *E.coli* transformant pour le gène *pab* AB cloné est de 60.000, qui est différent de l'estimation à partir de la séquence du gène (PM=77.900). Cette différence apparente peut être due à un comportement anormal de l'enzyme durant la filtration sur gel. La PABA synthétase purifiée de *S.lividans* à un PM de 47.000 (115) et probablement consiste en le seul composant PabB (475 aa, donnant PM=51.890) (6). Le PM de l'enzyme isolée de *S.lividans* (50.858) est aussi comparable à celle du polypeptide codé par *pab* B de *E.coli* (44).

La PABA synthétase de *S.griseus* est réprimée par les acides aminés aromatiques, le phosphate inorganique et PABA, mais pas par l'acide anthranilique. Des expériences *in vivo* montre que la PABA synthétase est aussi sujet à régulation par les acides aminés aromatiques (41).

Asturias et al. (7) utilisant *pab* AB de *S.griseus* comme sonde ont montré que l'effet inhibiteur du phosphate sur la biosynthèse de candicidine prend place au niveau de la transcription. Le phosphate inorganique (7,5 mM) réduit la synthèse de transcrit *pab* AB de 90-95% et par conséquent de PABA synthétase et de candicidine, mais stimule deux ou trois fois la synthèse de RNA total. Des résultats similaires sont obtenus chez *S.acrimini* J12239, une autre souche productrice de candicidine (8). Les bases moléculaires de cet effet ne seront pas décrites ici.

1.4.2.1.3. PABA comme initiateur de la biosynthèse de candicidine.

La structure chimique des heptaènes aromatiques montre que le résidu aromatique est lié covalamment à l'atome de carbone du cycle macrolide qui porte le lien lactone (Figure 1.9). Ceci suggère que la cyclisation se passe quand la chaîne polykétide formée par polymérisation d'unités en C2 et C3, utilisant comme initiateur le cycle aromatique, a atteint la longueur adéquate. Ce qui vient à l'appui de la fonction initiatrice du cycle aromatique dans la biosynthèse des polyènes macrolides est le fait que la céruléine inhibe rapidement l'incorporation de PABA à la candicidine (102). En effet, une inhibition rapide de l'incorporation de PABA à la candicidine ne devrait pas se produire avant que la réserve de cycle macrolide soit épuisée si PABA était attaché après que le cycle macrolide soit formé.

Un argument très fort en faveur de la fonction de PABA comme initiateur dans la voie des polykétides est fourni par la découverte de l'ORF3 localisée après *pab* AB. Celle-ci a une forte similarité avec une p-coumarate-CoA ligase, une enzyme impliquée dans l'activation d'unités initiatrices aromatiques dans la biosynthèse de polykétides de plantes. L'ORF3 du cluster de la candicidine peut coder pour une PABA-CoA ligase qui active PABA pour initier la biosynthèse de candicidine. Le gène codant pour cette activité enzymatique avait été prédit par Martin (94) et nommé *pab* L (ORF3=*pab* L) (22,90).

1.4.2.2. Biosynthèse du cycle macrolide aglycone.

Le cycle macrolide des antibiotiques macrolides polyènes est essentiellement formé d'acétate et propionate. Les études initiales de Birch et col. (12) montrent que le [1-, 2-, 3-¹⁴C]propionate et le [1-¹⁴C]acétate sont incorporés dans la nystatine aglycone (nystatinolide), alors que des résultats négatifs sont obtenus avec l'acide [2-¹⁴C]mévalonique et la [méthyl-¹⁴C]méthionine, indiquant l'absence de précurseurs en C5 ou C1. Des processus d'incorporations similaires sont observés dans la biosynthèse des antibiotiques macrolides polyènes lucensomycine (93), amphotérycine B (83,112), candidine (84,98), lévorine (11) et fungimycine (85). Le manque d'incorporation de groupes méthyles est aussi décrit pour l'amphotéricine B (112) et la candidine (84). Toutes ces données indiquent que les groupes méthyles exocycliques des macrolides polyènes (Figure 1.3) dérivent du carbone 3 du propionate plutôt que du groupe méthyle de la méthionine.

1.4.2.2.1. Synthétases d'acides gras et polykétides .

La biosynthèse du cycle macrolide des antibiotiques macrolides se passe par la voie des polykétides par condensation répétée tête-queue d'unités d'acétate et de propionate et a été déduite d'expériences avec la céruléine. La céruléine, un inhibiteur des réactions de condensation de la synthèse des acides gras (et polykétides), inhibe spécifiquement la biosynthèse de l'antibiotique macrolide polyène candidine par *Streptomyces griseus* (102). Depuis que la céruléine est connue pour inhiber la condensation de sous-unités malonyl-CoA dans la formation des acides gras, il a été conclu que les polyènes sont synthétisés via la voie des polykétides par des étapes de condensation similaires à celles se passant dans la biosynthèse des acides gras. Une étude récente sur les resvératrol et chalcone synthétases (polykétides synthétases spécifiques de plantes impliquées dans la biosynthèse de stilbènes et flavonoïdes) montre que une des six cystéines conservées (CYS 169) est la cible principale de la céruléine, mais les séquences entourant la cystéine 169 essentielle ne révèlent pas de similarités avec les sites actifs des enzymes de condensation d'autres polykétides synthétases et dans la biosynthèse des acides gras, indiquant que les resvératrol et chalcone synthétases représentent un groupe d'enzymes qui a évolué indépendamment d'autres enzymes de condensation (78).

La classe la plus abondante de voie de synthèse de chaîne d'acides gras (chaîne de carbone saturée non-branchée) commence par condensation d'une unité acétyl (initiatrice) avec une unité malonyl (élongatrice) pour mener à un intermédiaire en C4. Un carbone est éliminé sous forme de CO₂ durant la condensation; ce faisant, l'unité malonyl a donné une unité acétyl au produit. Le groupe cétone distal de la chaîne en élongation est alors "éliminé" par un groupe de trois réactions: kétoréduction à un hydroxyle, suivi par déshydratation à un groupe enoyl, et finalement une réduction de l'enoyle pour donner une fonction alkyle. D'autres cycles de condensation, réduction, déshydratation et une deuxième réduction font suite jusqu'à ce que la chaîne atteigne sa longueur finale, typiquement C16 pour l'acide palmitique ou C18 pour l'acide stéarique. Il y a essentiellement deux types de synthétases d'acides gras (FAS): (a) les FAS de type I, typique des vertébrés, dans lesquelles les différentes fonctions biochimiques (condensation, kétoréduction, déshydratation et enoyl réduction) sont menées à bien par des domaines distincts d'un large polypeptide multifonctionnel et (b) les FAS de type II, typiques des bactéries et plantes supérieures, dans lesquelles les différentes fonctions résident dans différents polypeptides (60).

I.4.2.2.2. Assemblage des polykétides.

La synthèse des polykétides peut être considérée comme impliquant une extension d'un set limité de choix fait par FAS; de plus les PKS ont besoin d'être plus hautement programmées que les FAS. Dans la synthèse des polykétides, le groupe β -kétone formé à chaque étape d'extension de la chaîne peut être ou non retenu. La nécessité de NADPH (un cofacteur des étapes de réduction et hydrogénation) doit être faible dans la biosynthèse des polyènes, puisque plusieurs d'entre eux sont simplement réduits à des groupes hydroxyles sans étape suivante de déshydratation et hydrogénation. Les étapes successives de condensation s'achèvent par la formation de la chaîne polykétide.

Les polykétides sont formés par une voie programmée dans laquelle une unité activatrice, activée en acétyl-CoA, propionyl-CoA ou p-aminobenzoyl-CoA, et un nombre hautement variable d'unités malonate ou méthyl-malonate, activées en malonyl-CoA et méthyl-malonyl-CoA, sont attachées ensemble suivant les mêmes réactions chimiques (Figure I.9).

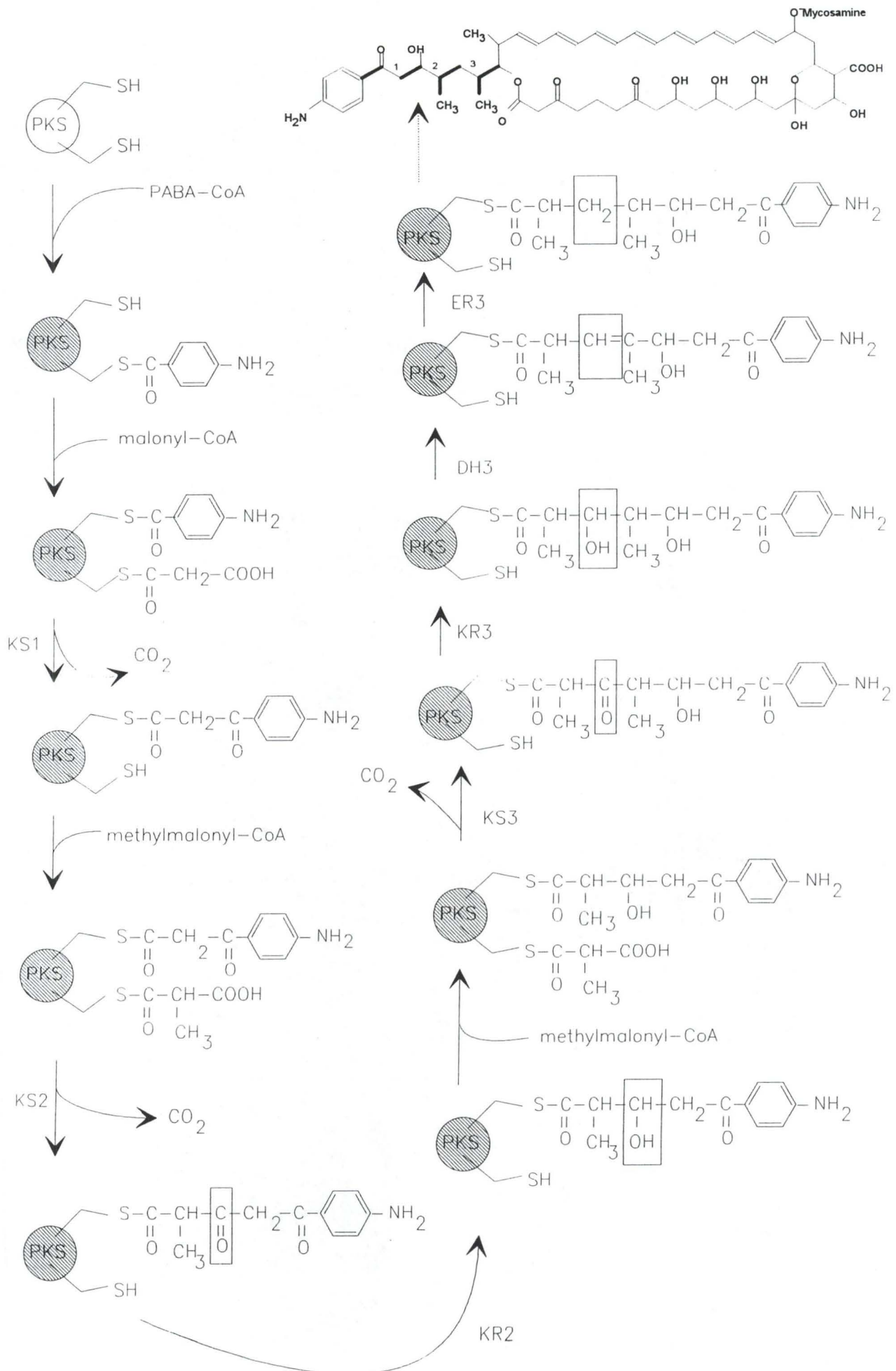


FIGURE I.9 Premières étapes de la voie biosynthétique de la candicidine. KS kétosynthétase; KR kétoréductase; DH déshydratase; ER énoyl-réductase.

Plusieurs clusters de gènes codant les enzymes des polykétides synthétases ont été clonés, partiellement ou complètement. Les polykétides aromatiques (entre autres tétracyclines, actinorhodine, anthracyclines) sont synthétisés par des PKS de type II, qui sont des complexes multi-enzymatiques similaires aux FAS de type II (91). Au contraire, les chaînes polykétides des antibiotiques macrolides tels que l'érythromycine et l'avermectine sont synthétisées par des PKS de type I consistant en de larges polypeptides multifonctionnels similaires aux FAS de type I mais consistant en unités répétées ou "modules" avec chaque site actif menant seulement une réaction dans l'assemblage, suivi d'une modification de chaque chaîne de carbone (21,89).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la candicidine et l'antibiotique FR-008 (un polyène aromatique heptaène contenant PAAP et un résidu carbohydrate différent de la mycosamine ou de la pérosamine) ont été clonés séparément dans deux laboratoires en usant une stratégie similaire. Dans chaque cas le gène *pab* AB de *S.griseus* est utilisé comme sonde pour cloner le set de gènes impliqués dans la biosynthèse des heptaènes aromatiques (voir plus loin). Hu et col. (61) ont décrit que l'ADN de *S.hygroscopus* localisé en aval du gène *pab* AB hybride fortement avec une sonde PKS du cluster de l'érythromycine, et par des expériences de disruptions et hybridations ils ont montré que les gènes codants la PKS pour le FR-008 aglycone couvre environ 105 kb du génome, impliquant suffisamment d'information génétique pour 21 modules PKS (1 module couvre 5 kb). Ceci est précisément le nombre d'étapes de condensations (4 unités méthyls-malonates et 17 unités malonates) nécessaires pour produire la chaîne de carbone de FR-008 ou de la candicidine par condensation d'unités d'élongations à une unité initiatrice de p-aminobenzoyl-CoA (Figure I.10). Macias (90), par chromosome walking sur l'ADN de *S.griseus*, a trouvé, par séquençage d'ADN, des modules PKS localisés en aval des gènes *pab* AB et *pab* L. Ces deux résultats établissent que l'aglycone des antibiotiques polyènes de la famille de la candicidine sont assemblés par des PKS modulaires.

Criado et col. (22) ont trouvé en amont du gène *pab* AB un gène codant pour une thioestérase pouvant être impliquée dans la biosynthèse de candicidine. Une enzyme avec cette activité doit nécessairement agir à la fin de la synthèse du polykétide pour détacher le cycle macrolide de la polykétide synthétase (60).

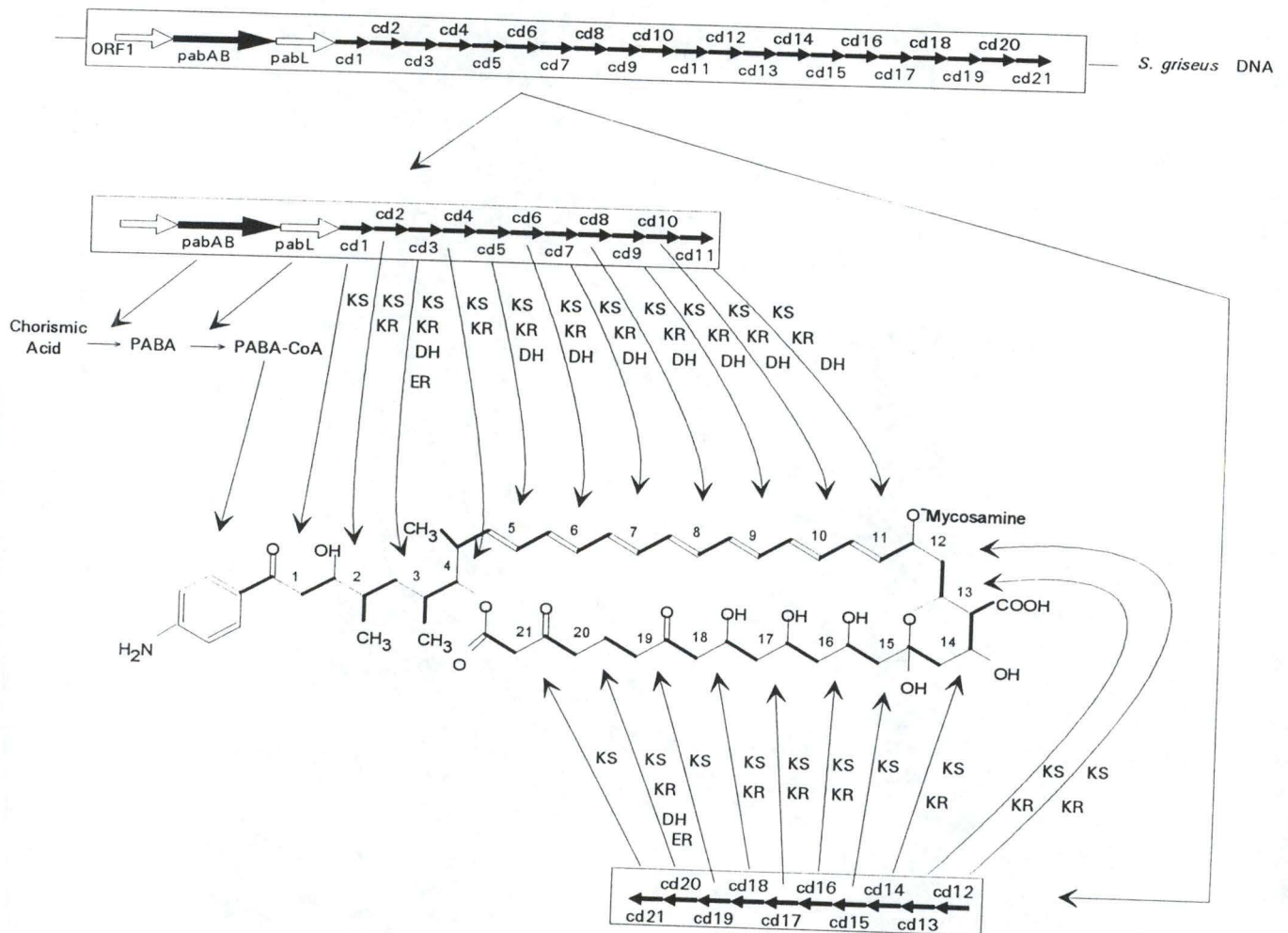


FIGURE I.10 Organisation génétique du cluster de la candicidine. KS: Kéto synthétase; KR: Kétoréductase; DH: Déshydrogénase; ER: Enoyl réductase.

I.4.2.3. Biosynthèse du sucre aminé.

Beaucoup de métabolites secondaires naturels provenant de bactéries ou de plantes sont glycosylés, le plus souvent par des 6-déoxyhexoses dérivés de TDP-glucose. Les dérivés 6-déoxyhexoses sont présents dans une variété d'antibiotiques d'actinomycètes, y compris les macrolides, polyènes et aminoglycosides, entre-autres.

Aucune étude *in vitro* n'a été menée spécifiquement sur la biosynthèse des résidus sucres aminés des antibiotiques macrolides polyènes; mais, la similarité avec la biosynthèse des sucres aminés des macrolides non-polyènes et des lipopolysaccharides bactériens fournit des données sur la voie biosynthétique probable.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides chez *Salmonella* ont été clonés et séquencés (136,144) et les gènes codant pour la biosynthèse du résidu déoxysucré de streptomycine a aussi été cloné (113). Dans chaque cas, des voies de biosynthèses des sucres sont proposées; toutes les transformations biosynthétiques de ces sucres se passent quand ils sont sous la forme de dérivés nucléosides diphosphates; le nucléoside diphosphate 4-kéto-6-déoxysucre correspondant décrit préalablement est aussi un intermédiaire (88,111). Les dérivés 4-kéto sont des intermédiaires clés communs de plusieurs voies métaboliques et mènent à la formation de nouveaux carbohydrates tels que des épimères, déoxysucres ou des carbohydrates branchés.

La formation de 4-kéto-6-déoxyhexose nucléoside diphosphate à partir de glucose-nucléoside diphosphate est catalysée par une nucléoside diphosphate-glucose oxyréductase NAD-dépendante codée par *str E* chez *S.griseus* et *rfb G* chez *Salmonella* (Figure I.11). Cette enzyme a été purifiée chez *Saccharopolyspora erythrae*, producteur d'érythromycine (134). L'étape suivante semble être la conversion du dTDP-4-kéto-6-déoxy-D-glucose en dTDP-4-kéto-3,6-didéoxy-D-glucose comme il se passe chez *Salmonella* et peut nécessiter les produits des gènes *rfb H* et *rfb I*. L'étape suivante dans la synthèse de la mycosamine doit être l'isomérisation du groupe cétone pour donner le dTDP-3-kéto-3,6-didéoxy-D-glucose. La biosynthèse du dTDP-4-kéto-4,6-didéoxy-D-glucose, intermédiaire dans la biosynthèse de pérosamine, peut avoir lieu par une enzyme similaire, mais sans isomérisation du groupe cétone.

Une étape supplémentaire dans la biosynthèse de chaque sucre aminés est le transfert d'un groupe aminé du L-glutamate au groupe cétone par une transaminase nécessitant du phosphate pyridoxal (104). La dernière étape est probablement l'épimérisation du glucose en mannose catalysée par une enzyme homologue à celle codée par *str M* (113).

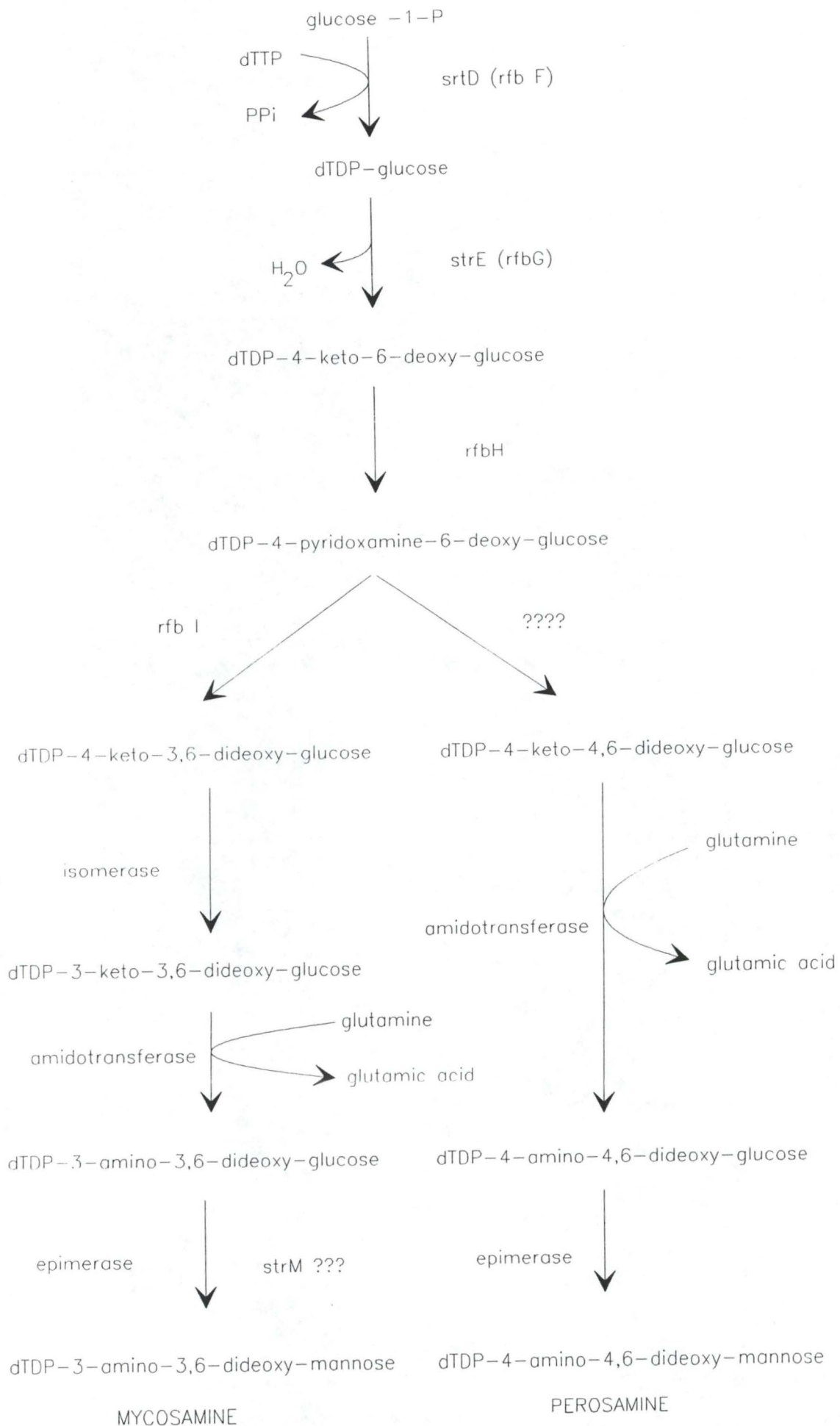


FIGURE I.11. Proposition de voie biosynthétique des résidus sucres aminés des antibiotiques macrolides polyènes

Le clonage des gènes impliqués dans la biosynthèse des déoxysucres ne nous aidera pas seulement à clarifier leurs voies biosynthétiques, mais aussi ouvrira la possibilité d'utiliser de tels gènes comme sondes universelle pour les voies qui incluent la formation de 6-déoxyhexoses. Ceci a été montré partiellement vrai chez les *actinomycètes* par Stockmann et Piepersberg (125) qui ont cloné les gènes *str* DE du producteur de streptomycine *S.griseus*. Ils trouvent que 70% des 43 souches testées donnent un signal positif avec la sonde et seulement 63% d'entre elles étaient connues pour contenir des 6-déoxyhexoses dans leurs métabolites secondaires. Les "faux" positifs synthétisent probablement des 6-déoxyhexoses de structure, fonction et localisation inconnues. D'un autre côté, aucune hybridation n'a été trouvée pour 8 souches connues pour produire des 6-déoxyhexoses (faux-négatifs). *S.nodosus* (producteur d'amphotéricine B; contenant de la micosamine), *S.noursei* (producteur de nystatine; mycosamine) et *S.coelicor* var. *aminophilus* (producteur de pérymicine; pérosamine) sont trouvées parmi les souches de *Streptomyces* donnant un signal positif avec les sondes (125). Un signal positif est trouvé pour l'ADN de *S.griseus*, producteur de candidicine avec la sonde *str* DE (17), mais pas avec l'ADN de *S.hygroscopus*, producteur de FR-008 (un polyène aromatique heptaène contenant PAAP et un résidu carbohydrate différent de la micosamine et de la pérosamine) (61).

L'attachement du résidu sucre aminé à l'anneau macrolide semble prendre place durant la sécrétion du polyène. Dans la biosynthèse de candihexine (un antibiotique polyène), il est observé que l'antibiotique intracellulaire consiste exclusivement en composants inactifs non-glycosylés, alors que l'antibiotique excrété contient un mélange de composants glycosylés et non-glycosylés (101). Cette évidence est en accord avec la théorie selon laquelle le cycle macrolide agit comme un transporteur du sucre aminé durant le processus de sécrétion (94). L'attachement du sucre durant la biosynthèse de l'antibiotique macrolide tylosine est également la dernière étape. Des mutants bloqués dans la biosynthèse des sucres ou dans les réactions glycosyltransférase sont capables de former le tylosolide aglycone correspondant (10). Des résultats similaires sont obtenus dans le cas de l'érythromycine (135), où l'attachement de TDP-mycarose et TDP-désosamine sont deux des quatre dernières étapes de sa biosynthèse.

I.5 REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA CANDICIDINE.

Les micro-organismes paraissent être programmés pour produire des antibiotiques seulement quand le taux spécifique de croissance descend sous un certain niveau (13). L'expression des gènes qui codent pour la biosynthèse d'antibiotiques ne se produit normalement pas à un taux élevé de croissance spécifique. De hauts niveaux de production d'antibiotiques se passent normalement seulement quand la majeure partie de la croissance cellulaire ("trophophase") s'est produite (126). Cela suggère que durant la phase de croissance active les synthétases de l'antibiotique ne sont pas formées, ou si elles le sont, que leur(s) activité(s) est(sont) inhibée(s). Dans le cas de la candicidine, il existe des évidences qui indiquent que la répression est exercée au niveau de la transcription (97).

I.5.1. Régulation par les acides aminés aromatiques.

La candicidine et probablement d'autres macrolides polyènes aromatiques sont sujets à régulation par les acides aminés aromatiques. La biosynthèse de la candicidine est inhibée *in vivo* par le L-tryptophane, la L-phénylalanine et, à un moindre degré, la L-tyrosine. Un mélange des trois acides aminés aromatiques inhibe la biosynthèse de candicidine à un plus grand niveau que ne le fait chaque acide aminé séparément. L'effet inhibiteur du tryptophane est partiellement "reversé" par du PABA exogène, suggérant que cet effet est exercé au niveau de la PABA synthétase (41). Des expériences *in vitro* ont clairement démontré que l'activité de la PABA synthétase est insensible à l'inhibition par PABA, OABA ou les acides aminés aromatiques. La PABA synthétase est réprimée par les acides aminés aromatiques et PABA mais pas par OABA (42). Ceci est un exemple d'un système régulateur fin dans lequel la biosynthèse d'un métabolite secondaire, la candicidine, est régulée par des mécanismes contrôlant la biosynthèse de métabolites primaires comme les acides aminés aromatiques.(Figure I.12)

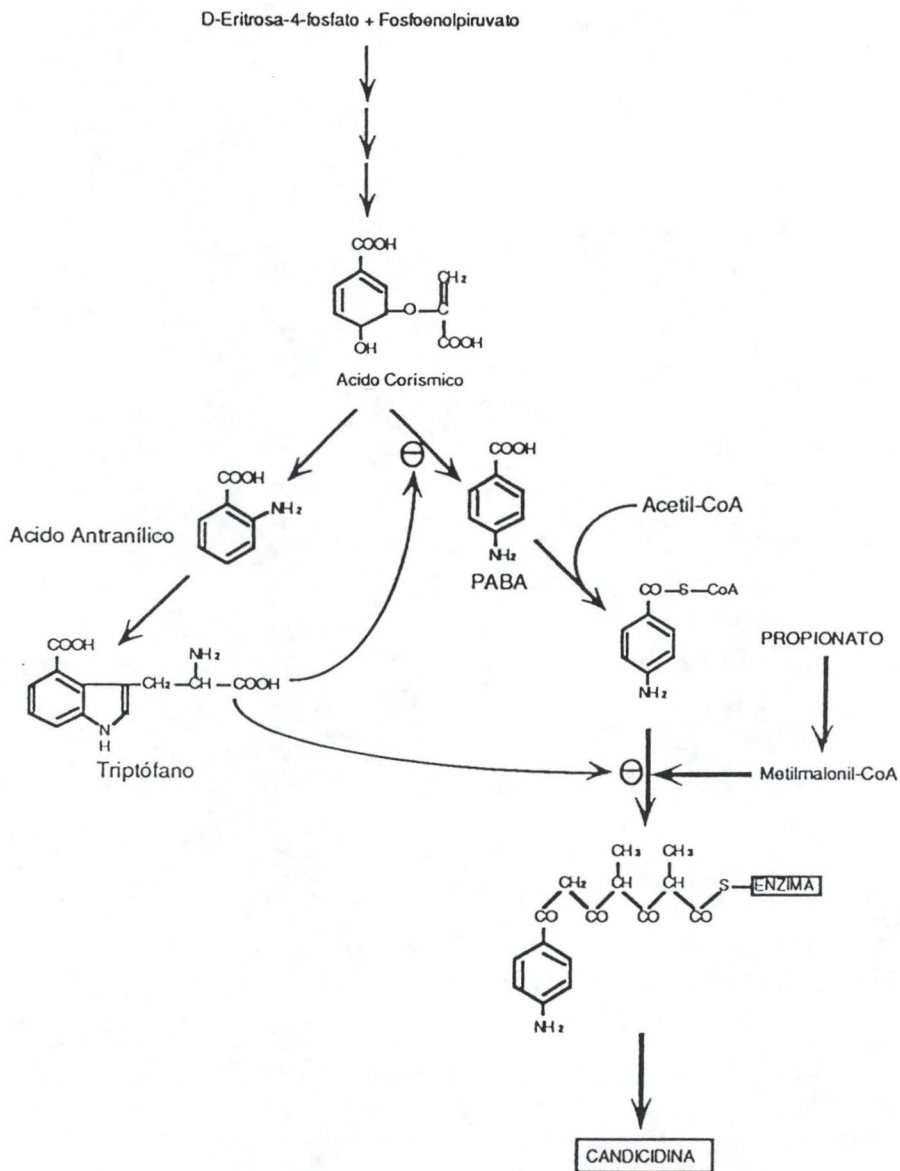


FIGURE I.12 Schéma de la voie biosynthétique de la candidicine et sa régulation par le tryptophane

I.5.2. Régulation par le phosphate.

La biosynthèse de beaucoup d'antibiotiques est inhibée *in vivo* par le phosphate (97, 103). Les antibiotiques sont synthétisés seulement à des concentrations en phosphate inorganique qui sont souvent suboptimales pour la croissance (< 10 mM). Le phosphate dans une marge de 3 à 500 mM permet d'excellentes croissances cellulaires, alors que 10 mM de phosphate supprime souvent la biosynthèse d'antibiotiques. Le même effet inhibiteur est exercé par les déoxyribonucléotides, parce qu'ils sont clivés durant l'incorporation dans les cellules de *S.griseus* (95,96).

De hautes concentrations en phosphate répréssent fortement la PABA synthétase de *S.griseus* (42). En utilisant un fragment interne du gène cloné *pab* AB, l'ARN spécifique *pab* AB a été quantifié en Northern blot. Quand de hauts niveaux de phosphate (7,5 mM) sont ajoutés au milieu de culture, la formation d'ARN spécifique de la PABA synthétase décroît de 95% (7). La répression par le phosphate apparaît être spécifique pour le transcrit du gène *pab* AB, puisque la synthèse totale d'ARN est stimulée par le phosphate.

Le mécanisme moléculaire par lequel plusieurs promoteurs de gènes de biosynthèse d'antibiotique sont régulés par le phosphate est toujours obscure. Soit un des promoteurs contient une "boîte" phosphate similaire (opérateur) reconnue par une protéine régulatrice (répresseur) commune de liaison à l'ADN dont le changement de configuration est régulé par le phosphate, soit, alternativement une protéine tel un facteur sigma spécifique ou une protéine interagissant avec l'ARN polymérase est en cause(100).

II.OBJECTIFS

II. OBJECTIFS.

Ce travail s'intègre dans un vaste cadre de recherche générale sur l'espèce *Streptomyces griseus*. Dans le laboratoire du Professeur Gil, sous les conseils de qui ce travail a été réalisé, l'accent est mis plus particulièrement sur la synthèse de l'antibiotique candidicine produit par *Streptomyces griseus*.

Les objectifs de ce travail sont au nombre de trois .

1) Les *Streptomyces* sont incapables d'incorporer de l'ADN exogène à leur état naturel. Ces dernières années, une transformation des protoplastes par des plasmides à l'aide d'un traitement au polyéthylène glycol a permis le développement rapide du clonage de gènes dans différentes espèces de *Streptomyces*. Pour appliquer cette méthode, il est nécessaire d'optimiser la croissance et d'établir les conditions optimales pour la formation des protoplastes et leur régénération. De plus, la transformation des fragiles protoplastes est pénible, difficile et fréquemment non reproductible.

La mise au point de la technique d'électroporation permettant la transformation des souches de *Streptomyces griseus*. de façon aisée et facilement reproductible est le premier objectif de ce travail.

2) Construction de nouveaux vecteurs plasmidiques contenant des fragments des gènes *pab* AB et *pab* L préalablement clonés par José Antonio Gil (40) et José Ramon Macias (90).

3) Disruption des gènes *pab* AB et *pab* L des souches de *Streptomyces griseus* en utilisant la technique de transformation par électroporation et les vecteurs construits préalablement.

III. MATERIELS ET METHODES.

III.1 MICROORGANISMES UTILISES.

-*Streptomyces griseus* IMRU 3570. C'est la souche originale productrice de candicidine découverte par Waksman.

-*Streptomyces griseus* JI 2212. Provient de la collection de microorganismes de l'Institut John Innes, Norwich, Grande-Bretagne.

-*Escherichia coli* DH5a (*sup* E44 *Dlac* U169 (*f80 lac* ZDM15) *hsd* R17 *rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi-1 rel* A1) Souche supprimée et déficiente en recombinaison utilisée pour la croissance sur plaque de plasmides et cosmides. Le *f80 lac* ZDM15 permet la "complémentation alpha" avec l'extrémité amino-terminale de la b-galactosidase codée dans des vecteurs de type pUC ou des phages de types M13 (Bethesda research laboratories, 1986)

-*Candida utilis* CECT 1061. Ce microorganisme est utilisé pour réaliser les bioessais de candicidine et fungimycine. Provient de la collection espagnole de cultures type, Burjasot, Valencia.

III.2 MILIEUX DE CULTURE.

III.2.1 Milieux de cultures pour *Streptomyces*.

-Milieu complexe de croissance **YED**. Sa composition est: Extrait de levure, 10 g; Glucose, 10 g et eau distillée jusqu'à 1000 ml. Se stérilise en autoclave à 121°C durant 20 minutes. Ce milieu est utilisé comme milieu d'inoculation vu qu'il supporte une croissance mycéliale élevée des différents *Streptomyces*. Il est également utilisé pour la croissance de *C.utilis* lors de la réalisation des bioessais.

-Milieux complexe de croissance **YEME + 34% Saccharose**. Sa composition est : Extrait de levure, 3 g; Extrait de malt, 3 g; Peptone, 5 g; Glucose, 10 g; Saccharose, 340 g et eau distillée jusqu'à 1000 ml. Se stérilise en autoclave à 121°C durant 20 minutes. Ce milieu est utilisé pour l'obtention de mycélium dispersé des différentes souches de *Streptomyces*, du à l'action de la saccharose.

Pour l'obtention postérieure d'ADN, ce milieu, une fois stérilisé, est supplémenté avec 10 ml de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1M et 24,8 ml de glycine à 20% p/v, préalablement stérilisés.

-Milieux complexe **R2Y2** modifié (148). Sa composition est: Saccharose, 103 g; K_2SO_4 , 0,25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10,12 g; Glucose, 0,1 g; Casaminoacide, 0,1 g; Solution d'éléments traces, 2 ml; Extrait de levure, 5 g; Tampon TES, 5,73 g; eau distillée jusqu'à 1000 ml et Agar, 22g. Le pH du milieu est ajusté à 7,3 avec du NaOH 1 M avant l'addition de l'agar. Se stérilise en autoclave à 121°C durant 20 minutes. Une fois stérilisé, on lui ajoute 10 ml de KH_2PO_4 à 0,5% p/v; 4 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5M et 15 ml de L-proline à 20% p/v, en conditions stérile.

La solution des éléments traces a la composition suivante: $ZnCl_2$, 40mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 200 mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 10 mg; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 10 mg et eau distillée jusqu'à 1000 ml.

Ce milieu, également dénommé **R5**, est utilisé pour la croissance et sporulation de distinctes souches de *Streptomyces*.

III.2.2 Milieux de culture pour *Escherichia coli*.

Milieu Luria-Bertani (**LB**) (149). Sa composition est: Triptone, 10 g; NaCl, 10 g; Extrait de levure, 5 g et eau distillée jusqu'à 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,3 avec du NaOH. La stérilisation se réalise en autoclave à 121°C durant 20 minutes.

Milieu **LA**. Sa composition est identique à celle du milieu LB mais contient 2% p/v de agar.

Milieu de culture **SOB** (150). Est utilisé pour faire croître des cellules de *Escherichia coli* pour induire l'état de compétence. Sa composition est la suivante: Triptone, 2% p/v; Extrait de levure, 0,5% p/v; NaCl, 10 mM; KCl, 2,5 mM; $MgCl_2$, 10 mM et $MgSO_4$, 10 mM.

Tous les composants sont stérilisés conjointement à l'exception des sels MgCl₂ et MgSO₄. Ceux-ci sont ajoutés au reste des composants après avoir été stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore en forme de solution stock concentrée (MgCl₂ 1M et MgSO₄ 1M). Le pH final doit être de 6,8-7,0. L'eau utilisée pour confectionner ce milieu doit être la plus pure possible.

Milieu de culture **SOB-agar**. Possède la même composition que le milieu SOB mais contient 2% p/v d'agar.

Milieu de culture **SOC**. Ce milieu, utilisé dans le processus de transformation de *Escherichia coli*, est similaire au milieu SOB mais contient du glucose 20 mM par addition de 1 ml de glucose 50% p/v à chaque 100ml de milieu SOB.

III.3. SOLUTIONS STOCKS.

Sulfate de kanamycine: Se prépare une solution de 50 mg/ml en eau distillée. Après la dissolution complète du produit, la solution est filtrée à travers un filtre de 0,22 µm de diamètre des pores. On réalise des aliquots qui sont congelés à -20°C.

Thiostrepton: Se prépare une solution de 50 mg/ml en DMSO (Diméthylsulfoxyde). La solution se conserve au frigo à +4°C.

TES. Sa composition est la suivante: Tris-HCl, 25 mM; EDTA, 25 mM; Sucrose, 0,3 M.

Tampon TAE (Tris-acétate). Sa composition est la suivante: Tris-acétate, 40 mM; EDTA, 2 mM; pH, 8,0. Se conserve à température ambiante.

TE. Sa composition est la suivante: Tris-HCl, 10 mM, pH 8; EDTA, 1mM, pH8. La solution est stérilisée en autoclave à 121°C durant 20 minutes.

III.4. MAINTENANCE DES MICROORGANISMES.

Dans toutes les méthodes qui sont détaillées par la suite, quant il s'agit de conserver des souches porteuses de plasmides, celles-ci furent ensemencées sur des milieux de culture préalablement supplémentés avec l'antibiotique nécessaire (sulfate de kanamycine ou thiostrepton). La concentration en antibiotique doit être adéquate aux niveaux de résistances conférés par les plasmides. Lors des premières manipulations, il est nécessaire de réaliser plusieurs ensemencements sur des milieux contenant des concentrations croissantes en antibiotiques pour déterminer laquelle est optimale dans les conditions de transformation.

III.4.1. Obtention et conservation des spores de *Streptomyces*.

Les deux souches de *Streptomyces* sont ensemencées sur plaques de Petri avec du milieu R5 et incubées à 28°C durant au moins 4 ou 5 jours, jusqu'à ce que les cultures soient bien sporulées. Les spores sont récupérées en ajoutant 9 ml d'eau distillée stérile sur chaque plaque et en gratant légèrement la superficie à l'aide de la pipette stérile au bout recourbé. La suspension ainsi obtenue est déposée dans un tube stéril et agitée violemment au vortex durant au moins une minute. Elle est ensuite filtrée à travers du coton hydrophile stéril dans le but de séparer le mycélium et les restes d'agar, qui sont retenus, des spores qui traversent le filtre. Le filtrat est centrifugé 10 minutes à 4500 r.p.m. en centrifugeuse de table et le sédiment est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile. Le sédiment final est agité durant quelques secondes au vortex pour le désagréger, et finalement est resuspendu dans du glycérol stéril à 20% p/v. Après une autre brève agitation pour homogénéiser la suspension de spores, on réalise des aliquots qui sont congelés à -20°C. Dans ces conditions, les spores se maintiennent viables durant des années (56).

III.4.2. Conservation des souches de *Escherichia coli*.

Les souches de *Escherichia coli* sont ensemencées sur plaques de Petri avec du milieu LA et sont incubées à 37°C durant 24-48 heures. Postérieurement, elles sont maintenues à 4°C et sont réensemencées chaque mois. Alternativement les souches peuvent croître en milieu LA à 37°C durant 12-24 heures. Passé ce temps, les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées avec une solution saline stérile (NaCl à 0,85% p/v).

Après une autre centrifugation, elles sont resuspendues dans du glycérol à 20% p/v et ensuite congelées à -20°C ou -70°C. Dans ces conditions les souches de *Escherichia coli* conservent leur viabilité durant des années.

III.5 ISOLEMENT DE L'ADN.

III.5.1 Isolement de l'ADN total de *Streptomyces*.

La méthode utilisée pour l'isolement d'ADN total de *Streptomyces* est basée sur celle décrite par Hopwood et col. (56).

Les spores de *Streptomyces* sont incubées durant 40-48 heures à 28-30°C, en agitation orbitale, dans des bouteilles munies de renforts latéraux pour assurer une bonne oxygénation du milieu.

Il est plus prudent de réaliser toute inoculation en deux étapes. Tout d'abord, ensemencé un petit volume de milieu (25 ml) et laisser pousser durant une nuit. Ensuite, à l'aide d'une pipette stérile, prélever un petit échantillon et observer au microscope si la souche a bien poussé et qu'elle n'est pas contaminée. Si ces deux paramètres sont bons, ensemencé un plus grand volume de milieu (100-500 ml) avec 5 ml du préinoculum.

Le milieu le plus adéquat est le YEME + 34% Saccharose car celui stimule une croissance désagrégée du mycélium en culture. Dans le cas de la récupération de l'ADN total, des cultures de 100 ml sont conseillées.

Le mode opératoire est le suivant:

- Centrifuger le milieu de culture 30 minutes à 8000 r.p.m.
- Resuspendre le culot dans 12 ml de TES.
- Ajouter du lysosyme à concentration finale de 2 mg/ml.
- Incuber une heure à 37°C.
- Ajouter 16 ml de 2X Kirby et agiter doucement.
- Ajouter 32 ml de phénol et agiter doucement.
- Centrifuger 10 minutes à 4500 r.p.m.
- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter 12 ml de phénol-chloroforme et agiter doucement.
- Centrifuger 10 minutes à 4500 r.p.m.

- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter 1/10 volume de NaAc 3M pH6 et 1 volume d'isopropanol.
- Laisser à température ambiante 10-120 minutes.
- Séparer les chromosomes du reste à l'aide d'une pipette Pasteur au bout recourbé.
- Resuspendre dans du TE. Le volume TE est fonction de la quantité d'ADN que l'on a obtenue.
- Conserver à 4°C.

REMARQUE: Il est très important de réaliser toutes ces étapes précautionneusement pour ne pas briser les chromosomes.

Solution:

2X Kirby. Sa composition es la suivante.:Sodio tri-isopropilnaftalène sulfonate, 2 g; Sodio 4-amino-salicylate, 12 g; Tris-HCl, 2M, pH 8, 5 ml; Phénol neutre, 6 ml; ajouter de l'eau jusqu'à 100 ml

III.5.2. Isolement d'ADN plasmidique de *Streptomyces*.

Dans cette méthode, décrite par Kieser, T. (56), les bactéries sont lysées par traitement au lysosyme ainsi qu'avec une solution qui contient du SDS et du NaOH. Le SDS dénature les protéines bactériennes et le NaOH dénature les ADNs chromosomique et plasmidique. Le mélange est neutralisé avec de l'acétate de potassium provoquant la réanillation rapide de l'ADN plasmidique. La majeure partie de l'ADN chromosomique et des protéines précipitent avec le SDS qui forme un complexe avec le potassium, et sont séparés par centrifugation. L'ADN plasmidique réanillé est concentré par précipitation à l'éthanol.

Mode opératoire:

- Partir d'une culture de 250 ml ayant poussé 48 heures à 28-30°C.
- Centrifuger 45 minutes à 8000 r.p.m.
- Resuspendre dans 10 ml de solution de lysosyme.
- Incuber 1 heure ou plus à 37°C.
- Ajouter 5 ml de NaOH/SDS et mélanger immédiatement au vortex
- Incuber 15 minutes à 70°C;
- Refroidir à température ambiante.

- Ajouter 5ml de KAc 5M et mélanger immédiatement au vortex.
- Placer dans la glace 15 minutes.
- Centrifuger 10-20 minutes, 4°C, 4000 r.p.m.
- Filtrer sur coton hydrofile.
- Précipiter avec 0,6 volume d'isopropanol.
- Garder à température ambiante 30 minutes.
- Centrifuger 10 minutes, 4°C, 4000 r.p.m.
- Laver avec EtOH 70%, puis 100% et laisser sécher.
- Resuspendre dans 0,5 ml de TE.
- Conserver à 4°C.

Solutions:

- Lysosyme: Concentration de 2mg/ml dans du TES.
 - NaOH/SDS: Pour 10 ml: NaOH 1M, 0,3 ml; SDS 20%, 1 ml; H₂O, 8,7 ml.
- A préparer juste avant utilisation.

III.5.3. Isolement d'ADN plasmidique de *Escherichia coli*.

Dans cette méthode, communément appelée mini-préparation, la bactérie qui contient l'ADN plasmidique est lysée par traitement au lysosyme, triton et chaleur. L'ADN chromosomique reste unis à la membrane bactérienne et est séparé par centrifugation. L'ADN plasmidique qui reste soluble est précipité avec de l'isopropanol.

Mode opératoire:

- Partir d'une culture d'1 ml saturée en milieu LB additioné de l'antibiotique adéquat. (Dans un tube Eppendorf 1,5 ml).
- Centrifuger 5 minutes à 12000 r.p.m.
- Jeter le supernatant.
- Resuspendre dans 400 µl de STET.
- Ajouter 40 µl de solution lysosyme.
- Agiter 2 minutes.
- Placer dans l'eau bouillante 1 minute.
- Centrifuger 10 minutes à 14000 r.p.m.
- Éliminer les débris cellulaire à l'aide d'un cure-dent.
- Précipiter avec 400 µl d'isopropanol à -20°C.
- Garder à -20°C durant 30 minutes.
- Centrifuger 10 minutes à 14000 r.p.m.

- Jeter le supernatant et sécher le tube.
- Resuspendre dans 40 ml de TE.
- Conserver à 4°C.

Solutions:

- STET: Tris-HCl, 50 mM, pH8; EDTA 50 mM; Triton X-100, 5% p/v et Saccharose 8% p/v.
- Lysosyme: Concentration 40 mg/ml dans du STET.

III.5.4. Mesure de la concentration en ADN.

La mesure de la concentration en ADN en solution se réalise facilement par spectrophotométrie. Une première mesure de la DO se fait à 260 nm. Une absorbance de 1 correspond à une concentration d'environ 50mg/ml. Une seconde mesure se fait à 280 nm et permet de vérifier la pureté de l'ADN en solution. Si le rapport de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm est supérieur à 2, on considère que la solution d'ADN est pure (56).

III.5.5 Purification d'ADN récupéré.

Avant de manipuler l'ADN que l'on vient de récupérer, il peut être nécessaire de le purifier ou de le concentrer plus.

Si la solution est contaminée par des protéines, ce qui se marque par la formation de bulles lorsque l'on agite le tube, une précipitation des protéines avec du phénol est réalisée. L'ADN est ensuite précipité avec du NH₄Ac, ce qui est également le traitement à réaliser lorsqu'il n'est pas suffisamment concentré.

Si la solution est contaminée par de l'ARN, un traitement à la RNase sera réalisé.

III.5.5.1. Précipitation et concentration des protéines.

Mode opératoire (56):

Pour la précipitation, commencer ici.

Dans des tubes Eppendorf:

- Ajouter 1 volume de phénol à la solution contenant l'ADN à purifier.
- Mixer 1 minute.
- Centrifuger 5 minutes à 14000 r.p.m.
- Récupérer la phase supérieure aqueuse.
- Répéter ces quatre étapes avec un volume de phénol-CiA (1::1)
Faire cette étape autant de fois que nécessaire, c'est à dire tant qu'il reste une phase intermédiaire.
- Répéter une fois avec CiA (Pour laver le phénol résiduel).

Pour la concentration, commencer ici.

- Précipiter avec 1/10 volume de NH_4Ac 7,5 M et 2 volumes EtOH 100%.
- Garder 15 minutes à -20°C .
- Centrifuger 15 minutes à 14000 r.p.m.
- Laver avec EtOH 70%.
- Laisser sécher.
- Resuspendre dans TE (Ajouter progressivement de petites quantité, 10 ml, jusqu'à ce que tout le culot soit resuspendu).

Solutions:

CiA: 24 volume de chloroforme et 1 volume Isoamyl alcool.

III.5.5.2. Traitement à la RNase.

Il suffit d'ajouter, à la solution contenant l'ADN à purifier, de la RNase pour une concentration finale de 40 mg/ml et d'incuber une heure à 37°C .

III.6. MANIPULATIONS DE L'ADN.

III.6.1. Digestion de l'ADN avec des endonucléases de restrictions.

Les endonucléases de restrictions sont des enzymes qui reconnaissent de petites séquences d'ADN et coupent l'ADN bicaténaire en des sites spécifiques contenus ou adjacents à/aux séquences de reconnaissance. Elles s'obtiennent fondamentalement de bactéries et leurs fonctions *in vivo* est la reconnaissance et la dégradation d'ADN étranger qui pourrait pénétrer dans la cellule.

Les endonucléases de restrictions les plus intéressantes pour leur application en biologie moléculaire sont sans aucun doute celles dites de type II. Ces enzymes possèdent deux activités séparées: une de restriction et une de méthylation. Elles se caractérisent par le fait de ne pas requérir d'ATP bien que si des ions Mg^{2+} et couper l'ADN bicaténaire dans ou près de la séquence de reconnaissance particulière formée typiquement par quatre ou six nucléotides avec un axe de symétrie binaire.

Chaque enzyme de restriction possède des conditions de réactions optimales. Les principales variables sont la température d'incubation et la composition du tampon de réaction, spécialement la force ionique de ce dernier. Chaque fournisseur d'enzymes de restriction spécifie quelles sont les conditions optimales et fournit avec l'enzyme le tampon adéquat. Normalement les tampons sont préparés comme des solutions concentrées dix fois et se conservent indéfiniment à $-20^{\circ}C$.

Les réactions de digestions sont menées à bien avec 0,2-1,0 mg d'ADN dans un volume total de 18 ml (additionné d'eau distillée si nécessaire), 2 ml du tampon de digestion correspondant et une ou deux unités de l'enzyme adéquate. Le mélange est incubé à $37^{\circ}C$ (ou autre si précisé) durant 1-2 heures. Les réactions sont terminées par incubation à $70^{\circ}C$ durant 10 minutes, extraction avec du phénol-chloroforme ou addition de 2 ml de solution stop (EDTA 100 mM quand postérieurement se réalise une déprotéinisation ou une ligation).

Dans le cas de digestions doubles, elles sont réalisées simultanément quand les endonucléases requièrent le même tampon. En cas contraire, on

utilise en premier l'enzyme fonctionnant avec la force ionique la plus basse. Après cette première digestion, on additionne 2-3 ml (pour chaque 20 ml de réaction) du second tampon plus concentré et on réalise la digestion avec le second enzyme.

III.6.2. Ligation des molécules d'ADN.

Pour unir covalentement différents fragments d'ADN générés par les distinctes endonucléases de restriction ont utilisées les enzymes dénommées ADN ligases qui se rencontrent dans toutes les cellules d'organismes vivants et sont impliquées dans des processus aussi importants que la réplication, réparation et recombinaison de l'ADN. Cependant, la plus fréquemment utilisée est la ligase du phage T4 produit du gène 30 de ce phage quand il infecte des cellules de *Escherichia coli*. Actuellement le gène 30 du phage T4 a été cloné, et la ligase se prépare à partir de cellules hyperproductrices.

La ligase du phage T4 (68 kDa) catalyse la formation d'un lien phosphodiester entre les extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate de l'ADN, soit dans des interruptions ou trous de la molécule, soit entre des fragments distincts. Elle requiert du Mg^{2+} et de l'ATP comme cofacteur, elle n'est pas inhibée par les ARNt mais l'est fortement par des concentrations en NaCl supérieure à 150 mM.

La température optimale de travail de la ligase du phage T4 est de 37°C, mais la ligation d'extrémités cohésives se fait normalement à 12-15°C pour établir un bon équilibre entre ajustement des extrémités et activité de l'enzyme. De plus hautes températures rendent difficile l'ajustement des extrémités cohésives par déstabilisation des ponts hydrogènes qui les maintiennent unis, alors que des températures inférieures diminuent l'activité de la ligase.

Le tampon de ligation est préparé en réalisant des aliquots de 100 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 avec du $MgCl_2$ 20 mM, de 50 ml d'ATP 4mM et de 50 ml de DTT 80 mM qui sont stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les solutions d'ATP et de DTT sont préalablement stérilisées par filtration. Pour chaque réaction de ligation sont mélangés les contenus de chacun des trois tubes et 20 ml sont utilisés pour dissoudre les ADNs à lier qui préalablement ont été précipités avec de l'éthanol et séchés en centrifugeuse à vide. Ensuite s'ajoute la ligase du phage T4 à une concentration de 1 u/mg d'ADN à

lier. Le mélange est incubé à 12-14°C durant 16 heures. L'efficacité de la ligation est contrôlée en gels d'agarose en utilisant comme contrôle les fragments d'ADN non-liés, de même que pour les transformations réalisées avec cette solution d'ADN.

III.7. TRANSFORMATIONS DE *Escherichia coli*.

Dans son état naturel, *Escherichia coli* est incapable d'incorporer de l'ADN exogène, mais cependant on a développé des méthodes pour obtenir cet objectif. La transformation de *E.coli* avec des plasmides a été démontré initialement par Cohen et col. (151) en se basant sur les observations de Mandel et Higa (152) lesquels ont démontrés préalablement que l'entrée d'ADN du bactériophage lambda dans des cellules de *E.coli* peut se stimuler au moyen d'un traitement de ces cellules avec du CaCl₂.

Toutes les méthodes de transformation développées depuis lors ont en commun que les cellules de *E.coli* et l'ADN interagissent productivement dans un milieu de cations divalents à basses températures favorisant la transformation. De plus, d'autres facteurs améliorent les fréquences de transformation comme: (1) un court traitement du mélange ADN/cellule à une température élevée (choc thermique), (2) l'inclusion de cations monovalents dans le tampon de transformation, (3) l'addition postérieure de chlorure d'hexamine de cobalt (III), (4) le traitement des cellules avec des solvants et réaction avec des sulfidriles, et (5) la croissance des cellules en milieux avec des niveaux élevés de magnésium (10-20 mM).

III.7.1. Induction de l'état de compétence de *Escherichia coli*.

-Partir de 5 ml de milieu SOB inoculé avec une colonie de 2-3 mm de diamètre ayant poussé à 37°C en milieu SOB-agar ou LA, incubé durant 10-12 heures à 37°C.

-A partir de cette culture, inoculer 100 ml de milieu SOB préchauffé à 37°C.

-incuber à 37°C avec une agitation vigoureuse (250-300 r.p.m.) jusqu'à atteindre une DO₅₅₀ de 0,48 unités.

-A ce moment, déposer la culture dans un bain de glace durant 10-15 minutes.

-Centrifuger 5 minutes à 4°C à 10000 r.p.m.

- Retirer exhaustivement le supernatant.
- Resuspendre les cellules dans 30 ml (1/3 du volume initial) de tampon RF1 refroidi à 4°C.
- Incuber en bain de glace 15 minutes.
- Centrifuger à 2500 r.p.m. à 4°C durant 5 minutes.
- Resuspendre dans 8 ml (1/12,5 volume initial de culture) de tampon RF2 préalablement refroidit à 4°C.
- Incuber 15 minutes en bain de glace.
- Réaliser des aliquots de 200 µl dans des tubes Eppendorf.
- Congeler les tubes en "flash" par immersion dans du nitrogène liquide.
- Stocker les cellules compétentes ainsi obtenues à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tampons:

RF1: Sa composition est: RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM et glycérol 15% p/v, pH 5,8. Stérilisé par filtration.

RF2: Sa composition est: MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM et glycérol 15% p/v, pH 6,8. Stérilisé par filtration.

III.7.2. Transformation avec de l'ADN.

- Ajouter 0,1 mg d'ADN, dans un maximum de 20 µl de TE, à 200 µl de suspension de cellules compétentes décongelées et maintenues en bain de glace.
- Agiter suavement le tube.
- Incuber en bain de glace durant 10-60 minutes.
- Soumettre le mélange à un choc thermique (42°C, 90 secondes).
- Refroidir de nouveau en bain de glace.
- Additionner 800 µl de milieu SOC et incuber à 37°C durant 30-60 minutes avec agitation modérée (période d'expression phénotypique).
- Plaquer en milieu LA avec l'antibiotique de sélection adéquat.
- Incuber à 37°C durant 24 heures pour obtenir la croissance des colonies transformantes.

III.8. ELECTROPHORESE DE L'ADN.

La technique la plus utilisée pour séparer, analyser et purifier des fragments d'ADN est l'électrophorèse en gel, soit d'agarose soit de polyacrylamide. Cette technique est simple, rapide à réaliser et capable de résoudre des fragments d'ADN qui ne peuvent être séparés adéquatement par d'autres techniques comme la centrifugation en gradient de densité. De plus, la localisation de l'ADN peut être réalisée directement par tincture avec de basses concentrations d'un agent intercalant fluorescent, par exemple le bromure d'éthidium (EtBr). Ainsi on peut détecter des quantités aussi petites que 1-10 ng d'ADN par examen direct du gel en lumière ultraviolette de 240 à 304 nm. (153). Les bandes détectées peuvent être découpées et l'ADN contenu être extrait et utilisé pour une grande variété de manipulations.

Le voltage appliqué aux extrémités d'un gel génère un champ électrique d'une intensité définie par la longueur du gel et la différence de potentiel appliquée à ses extrémités (V/cm). A la différence des protéines, les acides nucléiques ne sont pas amphotères et gardent leur charge négative à quelques pH utilisés grâce aux charges négatives des phosphates présents au long du squelette de la molécule d'ADN, et de ce fait migrent toujours vers l'anode. La vitesse de migration est limitée par la force de friction imposée par la matrice du gel. Alors que la charge et/ou la taille peuvent affecter la vitesse à laquelle une macromolécule traverse le gel, la proportion charge/masse est la même pour des molécules d'ADN de différentes longueurs. De ce fait, c'est la taille de l'ADN qui détermine la vitesse à laquelle les fragments passent à travers le gel. Ceci permettant une séparation efficace des mélanges de fragments d'ADN par électrophorèse.

La mobilité électrophorétique de l'ADN à travers un gel dépend de plusieurs facteurs (154):

- 1. Taille moléculaire de l'ADN.
- 2. Concentration en agarose.
- 3. Conformation de l'ADN.
- 4. Courant appliqué.
- 5. Composition en bases et température.
- 6. Présence d'agents intercalants
- 7. Composition du tampon de l'électrophorèse.

Les deux tampons d'électrophorèses les plus utilisés sont TAE et TBE (Voir plus haut). Entre ces tampons il y a seulement des niveaux de différences entre leur effet sur la mobilité électrophorétique de l'ADN, et le principal facteur à considérer pour utiliser l'un ou l'autre réside dans leur capacité relative de tamponnement. Le tampon TAE est le plus couramment utilisé indépendamment qu'il se désagrège plus facilement durant des électrophorèses prolongées ou de haut voltage.

III.8.1. Préparation des gels d'agarose.

Les gels sont préparés avec de l'agarose de type II (Sigma Chemical Co.) resuspendu dans du tampon d'électrophorèse (TAE ou TBE) en distinctes concentrations (0,6-1,5% p/v). Après avoir déposé le mélange dans un Erlenmeyer, et ensuite avoir mesuré le poids de celui-ci, on le chauffe jusqu'à ébullition au four micro-ondes. On laisse refroidir jusqu'à approximativement 70°C et l'évaporation est compensée par addition d'eau distillée jusqu'à atteindre le poids de départ préalablement déterminé. Lorsque la solution est à quelques 50°C, on verse la quantité nécessaire (50 ou 150 ml) sur des supports horizontaux de métacrilate de 8,0X12,5 cm ou 20,0X24,6 cm respectivement, sur lesquels ont été disposés préalablement un peigne en teflon de 1 à 3 mm d'épaisseur et de 1 mm de la superficie de la bande, pour former des poches dans lesquelles seront déposés plus tard les mélanges d'ADN.

Les fourchettes effectives de séparation des gels d'agarose dépendent de la concentration de celle-ci et se trouve ci-dessous.

Agarose (% p/v)	Fourchette effective de résolution de fragments linéaires d'ADN (kb)
0,5	30 à 1,0
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

III.8.2. Détermination des tailles des fragments d'ADN générés par digestion avec des endonucléases de restriction.

La taille des fragments d'ADN obtenus par traitement avec des endonucléases de restriction est calculée par la méthode de Southern (153). Pour calculer la taille des fragments d'ADN de plus de 0,5 kb, on choisit trois des fragments d'ADN du phage lambda obtenus par digestion avec l'enzyme *Hin* dIII et leurs distances de migration sont mesurées après électrophorèse en gel d'agarose. Le choix de ces trois fragments de référence est réalisé de façon telle qu'entre leur migration se trouvent comprises celles des fragments dont on veut calculer les tailles.

La taille des fragments de l'ADN du phage lambda obtenus par digestion avec *Hin* dIII sont: 23; 9,59; 6,68; 4,29; 2,28; 1,94 et 0,58 kilobases (kb).

Les formules utilisées pour calculer la taille des fragments d'ADN sont les suivantes:

$$A = \frac{L_1 - L_2}{L_2 - L_3} \times \frac{M_3 - M_2}{M_2 - M_1} \quad M = \frac{M_3 - (M_1 \times A)}{1 - A}$$

$$B = \frac{1}{M_1 - M} \quad C = \frac{1}{M_2 - M}$$

$$K_1 = \frac{L_1 - L_2}{B - C} \quad K_2 = L_1 - \frac{K_1}{M_1 - M}$$

$$L_x = \frac{K_1}{M_x - M} + K_2$$

où L_1 , L_2 et L_3 sont les tailles des trois fragments choisis de l'ADN du phage lambda digéré avec *Hin* dIII. M_1 , M_2 et M_3 sont les distances de migrations de ces fragments exprimées en millimètres (mm). A , M , B , C , K_1 et K_2 sont des constantes qui se calculent pour chacun des trois fragments du phage lambda et qui sont nécessaire pour calculer la taille du fragment que nous désirons (L_x). M_x est la distance de migration en mm du fragment problème.

III.9. RECUPERATION DE FRAGMENTS D'ADN.

Pour la manipulation génétique d'ADN il est nécessaire de purifier les différents fragments isolés par électrophorèse. Cet objectif est réalisé en utilisant le kit GENE CLEAN II mis au point par *BIO 101 Inc.*

La méthode est la suivante:

-Couper les bandes d'ADN du gel d'agarose, sous lampe UV après l'incorporation de bromure d'éthidium.

-Déterminer le volume de la bande en la pesant (1 g égale approximativement 1 ml).

-Placer la bande dans un tube de microcentrifuge.

-Ajouter 3 volumes de solution stock NaI, ce qui donne une concentration finale de NaI autour de 4 M.

-Placer le tube dans un bain-marie entre 45 et 55°C jusqu'à dissociation complète de l'agarose. Pour plus de facilité, mixer le tube toute les deux minutes.

-Ajouter le GLASSMILK en sachant que: 1. La quantité de GLASSMILK qui doit être utilisée est basée sur la masse d'ADN contenu dans la solution de NaI. 2. Plus grande est la concentration en particules de silicate, plus grande est la fréquence de collision entre l'ADN et la matrice de silicate.

Sachant ceci, ajouter 5 ml de GLASSMILK à des solutions contenant 5 mg ou moins d'ADN. Ajouter un 1 ml additionnel pour chaque 0,5 mg au-dessus de 5 mg.

-Mélanger et placer dans la glace 5 minutes, ceci permet la fixation de l'ADN à la matrice de silicate. Mélanger toute les 1-2 minutes pour s'assurer que le GLASSMILK reste suspendu.

-Centrifuger quelques secondes.

-Jeter le supernatant (solution NaI).

-Laver 3 fois le culot avec la solution NEW, en additionnant à chaque fois 10 à 50 volumes de NEW WASH refroidit dans la glace.

-Après avoir éliminé le supernatant au troisième lavage, centrifuger le tube encore quelques secondes et éliminer les dernières traces de liquide.

-Resuspendre le culot dans du TE ou de l'eau distillée.

-Incuber 2-3 minutes à 45-55°C.

-Centrifuger quelques secondes.

-Retirer précautionneusement le supernatant qui contient l'ADN élué.

-Répéter une fois les quatres dernières étapes.

-Le résultat est normalement une récupération à 90% de l'ADN qui était contenu dans le gel d'agarose.

Solutions:

-Nal: solution concentrée 6 M.

-NEW concentré: solution concentrée de NaCl, Tris et EDTA. Préparation du NEW WASH: Ajouter 14 ml de NEW concentré à 280 ml d'eau distillée.

Ajouter 310 ml d'éthanol 100% et mélanger.

Se conserve à -20°C.

-GLASSMILK: C'est une solution préparée spécialement d'une matrice de silicate suspendue dans de l'eau. Se conserve à 4°C.

IV RESULTATS

IV.1 MISE AU POINT DE L'ELECTROPORATION.

La mise au point de la technique de transformation par électroporation des souches de *Streptomyces griseus* IMRU 3570 et JI 2212 a été réalisée en se basant sur les résultats obtenus par Pigac et Schrempf (156).

Différents paramètres sont à prendre en compte pour obtenir de bons résultats:

- 1. Les conditions de croissance.
- 2. Préparation des cellules électro-compétentes.
- 3. L'intensité du courant appliqué et la longueur du "pulse".
- 4. La concentration en ADN exogène.
- 5. La dilution et la sélection des transformants.

Pour les deux premiers paramètres, les valeurs appliqués sont celles définies dans l'article de référence (156). Les résultats obtenus ayant été bons, il n'a pas été jugé intéressant de revenir par la suite sur ceux-ci.

IV.1.1. Contrôles.

Deux contrôles préliminaires ont été réalisés:

- 1. Etaler sur plaque de Pétri contenant du milieu R5 les cellules compétentes pour contrôler que celles-ci sont viables.
- 2 Etaler sur plaque de Petri contenant du milieu R5 additionné de Thiostrepton les cellules compétentes, pour contrôler que celles-ci ne possèdent pas le gène de résistance au thiostrepton.

Deux contrôles supplémentaires sont nécessaires:

- 3. Etaler sur plaque de Pétri contenant du milieu R5 les cellules compétentes ayant subi une électroporation (12 kV et 800 W) sans présence d'ADN exogène, pour contrôler que les cellules sont capables de se régénérer après avoir subi le choc électrique.

-4 Etaler sur plaque de Pétri contenant du milieu R5 additionné de thiostrepton, les cellules compétentes ayant subi une électroporation (12 kV et 800 W) sans présence d'ADN exogène, pour contrôler que les cellules sont incapables de se régénérer après avoir subi le choc électrique dans un milieu contenant l'antibiotique de sélection.

IV.1.2. Intensité du courant et longueur du pulse.

Jusqu'à une intensité électrique de 7kV/cm, le pourcentage de colonies survivantes est proche de 100%. Quand le courant électrique appliqué se trouve entre 10 et 12,5 kV/cm, le nombre de colonies survivantes chute de 80 à 40%.

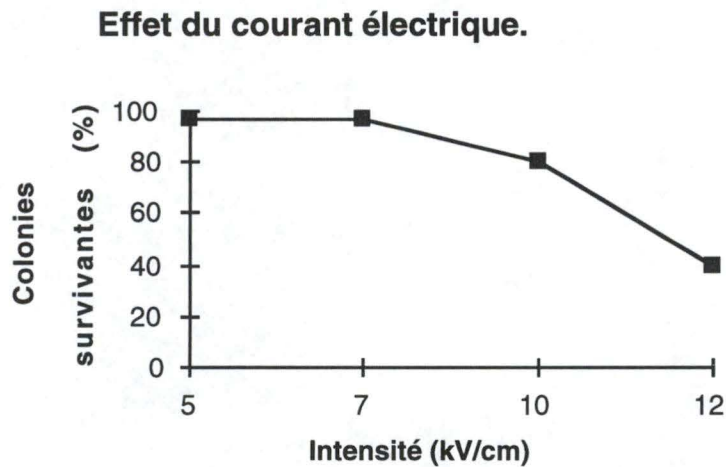


FIGURE IV.1. Effet du voltage initial du pulse appliqué sur la survie de 50 μ l de cellules électroporées à 25 μ F et 400 Ω en présence de 10 ng d'ADN.

Environ 2×10^3 transformants sont obtenus avec 1 μ g d'ADN de pIJ702 à 5 kV/cm. Ce nombre augmente à environ 3×10^5 à 10 kV, et est toujours le même à 12,5 kV. De plus, des arcs électriques se passent fréquemment à 12,5 kV.(FIGURE IV.2).

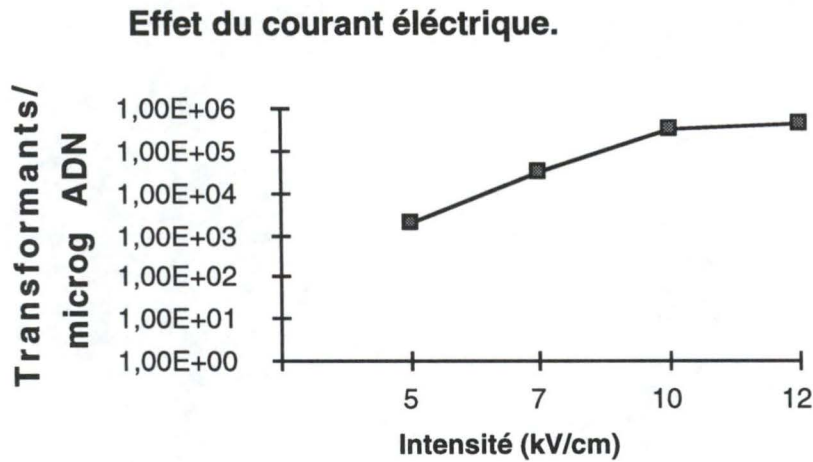


FIGURE IV.2. Effet du voltage initial du pulse appliqué sur l'efficacité de la transformation de 50 ml cellules électroporées à 25 μ F et 400 Ω en présence de 10 ng d'ADN.

Pour ces raisons, un courant électrique de 10 kV/cm est utilisé en routine.

L'effet d'un changement de la longueur du pulse (temps constant), réalisé par la modification de la taille de la résistance placée en parallèle avec l'échantillon dans le Pulse Controller (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.*), est également examiné.

La durée du pulse diminue le nombre de colonies survivantes, qui décroît à environ 33% à 800 Ω (Figure IV.4.). Comme montré sur la figure IV.2.2., le nombre de transformants passe de 3×10^4 à 200 Ω à 2×10^6 à 800 Ω . (Figure IV.3). De plus longs pulses ne seront pas appliqués pour éviter les arcs électriques.

Effet de la résistance parallèle.

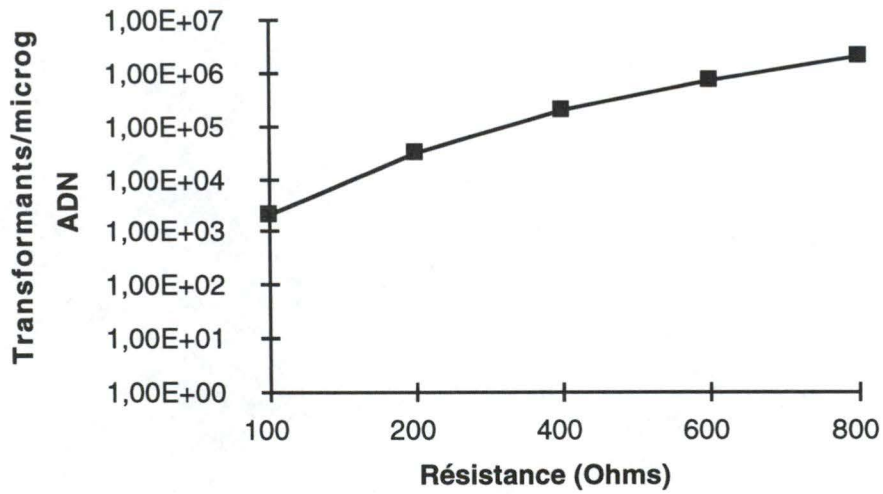


FIGURE IV.3. Effet de la résistance parallèle externe sur l'efficacité de transformation à 25 μ F et 10 kV/cm avec 50 μ l de mycélium et 10 ng d'ADN.

Le courant électrique et la résistance appliqués en routine sont donc de 10 kV/cm et 400 Ω .

Effet de la résistance parallèle.

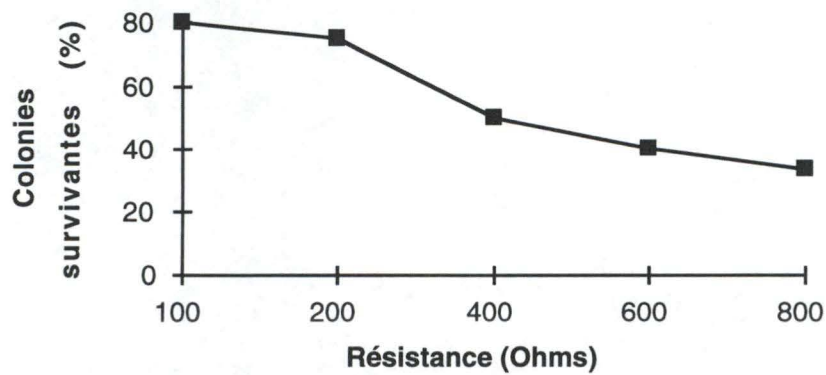


FIGURE IV.4. Effet de la résistance parallèle externe sur la survie des colonies lors de l'électroporation à 25 mF et 10 kV/cm avec 50 μ l de mycélium et 10 ng d'ADN.

IV.1.3. Effet de la concentration en ADN.

Avec 1 ng de pGM 7, approximativement $3,2 \times 10^3$ transformants sont obtenus à 10 kV et 400 Ω . Le nombre de transformants (CFU/ml) augmente proportionnellement quand la concentration en ADN passe de 10 ng à 2 μg . Le niveau de saturation n'est pas atteint quand 2 μg d'ADN sont additionnés. (FIGURE IV.5. et IV.6.).

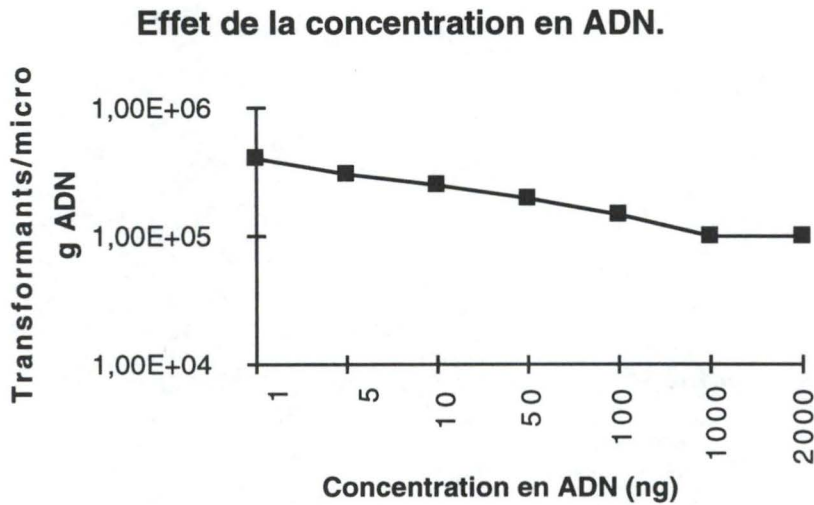


FIGURE IV.5. Effet de la concentration en ADN sur l'efficacité de la transformation. Les conditions d'électroporation sont: 25 μF , 10 kV/cm et 400 Ω .

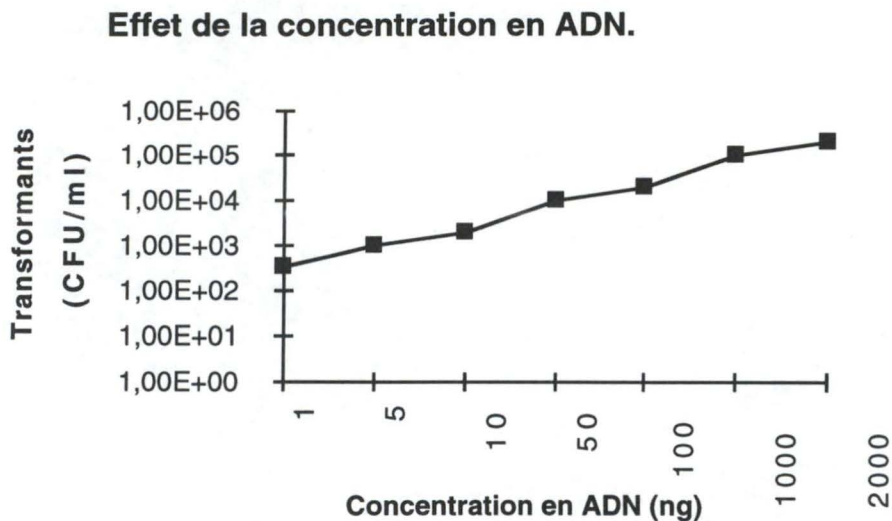


FIGURE IV.6. Effet de la concentration en ADN sur le nombre de transformants. Les conditions d'électroporation sont: 25 μF , 10 kV/cm et 400 Ω .

IV.1.4. Effet de la dilution et de la sélection des transformants.

Après électroporation, il est essentiel de diluer l'échantillon avec un milieu contenant du Mg^{2+} et du sucrose pour rendre possible une régénération rapide des cellules endommagées. Ce milieu est déjà utilisé avec succès dans la régénération des protoplastes de *Streptomyces griseus* (voir Matériels et Méthodes). Comme les mycéliums de *Streptomyces* tendent à s'agréger en présence de PEG, le nombre de transformants atteint son niveau le plus bas quand la suspension électroporée est diluée 3 fois. Le nombre de colonies augmente considérablement, environ 20 fois, lorsque la suspension est diluée 16 fois (Tableau IV.1).

TABLEAU IV.1.Effet de la dilution après le choc électrique sur le nombre de transformants obtenus.

Dilution	Nombre de Transformants (CFU/ml)	Efficacité de la Transformation (Transformants/ml/mg ADN)
1::3	2,20E+02	2,20E+04
1::5	2,00E+03	2,00E+05
1::10	1,60E+03	1,60E+05
1::16	4,80E+03	4,80E+05
1::20	2,70E+03	2,70E+05

Les conditions d'électroporation sont : 25 μ F, 10 kV/cm et 400 Ω . Les expériences sont réalisées avec 10 ng de plasmide.

Après incubation à 30 C durant 3 heures avec agitation, le mycélium est étalé sur milieu R5 contenant du thiostrepton. Dans ces conditions, peu de transformants sont obtenus. Il est préférable d'étaler les cellules sur milieu R5 sans thiostrepton et de les incuber 10-12 heures à 37 C. Une fois que les colonies ont poussé mais pas encore sporulé, additionner le thiostrepton à une concentration de 40 μ g/ml. Ceci afin de laisser le temps au gène de résistance d'être exprimé. N'oublions pas que ce gène se trouve en une seule copie exprimable dans la cellule, le plasmide devant s'insérer dans le génome pour que les gènes qu'il porte soit exprimé.

IV.1.5. Protocole de haute efficacité pour l'électroporation.

Les paramètres optimisés pour transformer efficacement des mycéliums de *Streptomyces griseus* avec 100 ng de pGM7 sont résumés au Tableau IV.2. Dans ces conditions, le taux de transformants obtenus est reproductible (10^5 à 10^6 / μg ADN). En comparaison, la transformation des protoplastes est considérablement moins reproductible.

TABLEAU IV.2. Résumé des efficacités de transformations aux conditions optimisées.

Intensité électrique (kV/cm)	Résistance (Ohms)	Temps constant (ms)	Nombre de Transformants (CFU/ml)	Efficacité de la transformation (transformants /ml/mg ADN)
10	400	9,1	1,70E+02	1,70E+05
10	600	13,5	5,20E+02	6,00E+05
10	800	17,9	1,70E+03	1,80E+05
12,5	400	7,6	3,40E+02	3,00E+05
12,5	600	11	5,20E+03	7,50E+05

Les conditions d'électroporation sont: 25 μF , 10 kV/cm et 400 Ω . Les expériences sont réalisées avec 10 ng de plasmide et l'échantillon est dilué 16 fois après le pulse électrique.

IV.2. CONSTRUCTION DES VECTEURS PLASMIDIQUES SUICIDES DE DISRUPTION DE *pab* AB et *pab* L

L'objectif final étant de disrupter les gènes *pab* AB et *pab* L, il est nécessaire de construire des plasmides suicides contenant des fragments de chacun de ces gènes.

IV.2.1. Plasmides parentaux.

Plusieurs plasmides sont utilisés pour mettre au point l'électroporation et construire les vecteurs qui seront utilisés avec celle-ci.

IV.2.1.1. pGM7.

C'est le plasmide utilisé pour mettre au point la technique de transformation par électroporation des mycéliums de *Streptomyces griseus*. Il est également utilisé pour construire le vecteur pULJM 14 (voir plus loin). C'est un plasmide "naturel" de *Streptomyces*. Il contient deux gènes. Le premier est un gène de résistance au thiostrepton, un antibiotique qui agit en inhibant les ribosomes des cellules qu'il atteint. Le deuxième gène est celui de la mélanine, un marqueur de couleur noire. Lorsque les cellules sont transformées par ce plasmide et que ce gène est exprimé, les colonies deviennent noires au lieu de blanches. (Figure IV.2.1.)

De plus, ce vecteur est un plasmide suicide, ce qui veut dire qu'il ne peut se répliquer et exprimer les gènes qu'il porte s'il n'est pas intégré dans le génome de la cellule hôte..

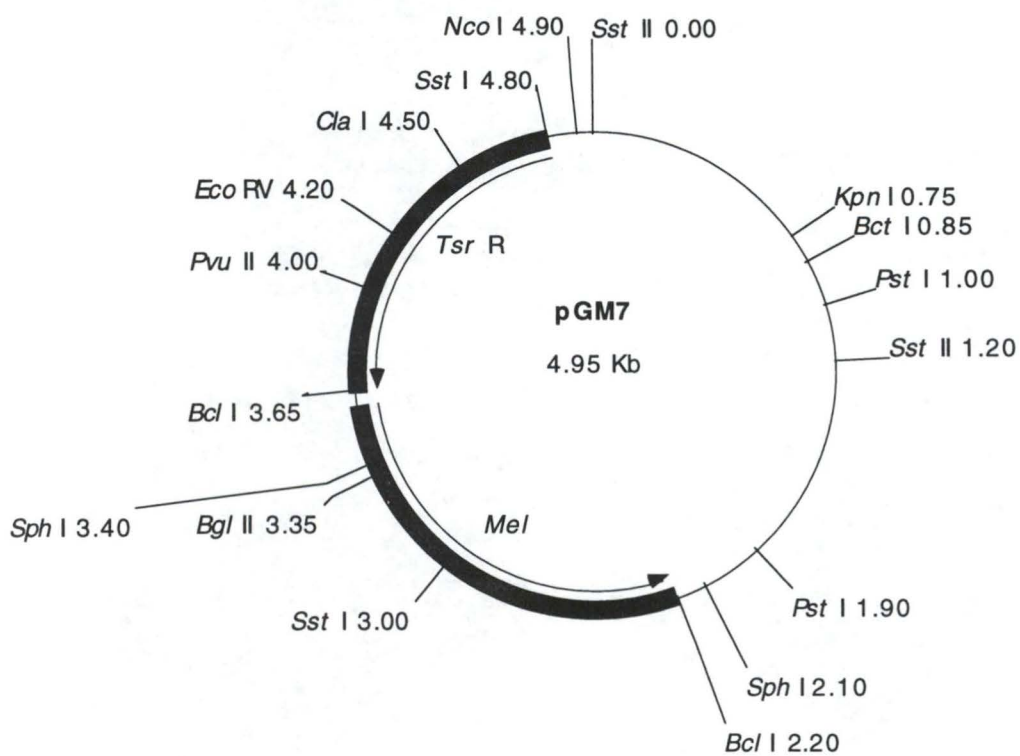


FIGURE IV.2.1. Schéma du plasmide pGM7 contenant deux gènes: celui de la résistance au thiostrepton (*Tsr R*) et celui de la mélanine (*Mel*).

IV.2.1.2. pBluescript

C'est un plasmide de *E.coli* qui porte une origine de réplication pour *E.coli*, un gène de résistance à l'ampicilline, un antibiotique ainsi que différents autres gènes ou fragments d'autres gènes dont nous n'aurons pas besoin pour ce travail (Fig IV.2.2.).

Ce plasmide est utilisé pour construire le vecteur pULJM 14 (voir ci-dessous).

IV.2.1.3. pULCS 14.

Ce plasmide, capable de se répliquer chez *E.coli* et suicide chez *Streptomyces*, a été construit par José Ramon Macias en se basant sur plusieurs postulats de départ.

Il doit être capable de se répliquer dans *Escherichia coli* et posséder un marqueur de sélection exprimable dans cette même souche. Le plasmide pBluescript (Voir plus haut) a été choisi, il est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline, un antibiotique.

Ce plasmide suicide chez *S. griseus* doit posséder un marqueur de sélection exprimable dans cette souche. Une portion de la matrice du plasmide pGM7 (voir plus haut) a été choisie à cette fin.

Ces deux plasmides ont été linéarisés aux sites de restrictions Sph I. Par cette restriction, le gène de la mélanine porté par le plasmide pGM7 est disrupté.

Les deux plasmides linéarisés ont été recircularisés l'un avec l'autre. Deux orientations sont possibles: soit les deux gènes de résistance sont dans la même orientation, soit ils sont en orientation inverse. Dans le cadre de ce travail, seul le plasmide où les deux gènes sont en orientation opposée a été utilisé. (Figure IV.2.3.).

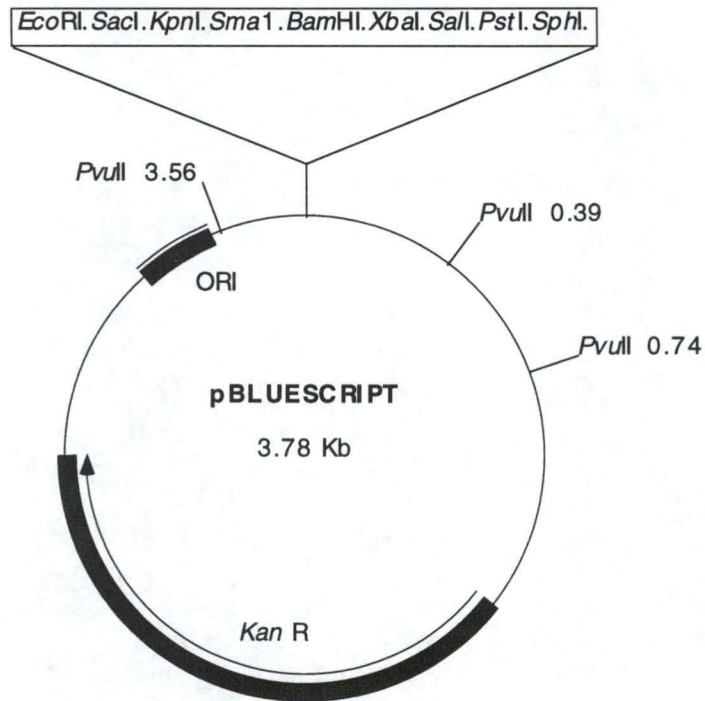


FIGURE IV.2.2. Schéma du plasmide pBluescript utilisé pour la construction du plasmide pULCS 14. Kan R: Gène de résistance à la Kanamycine; ORI: origine de répliation de *E.coli*.

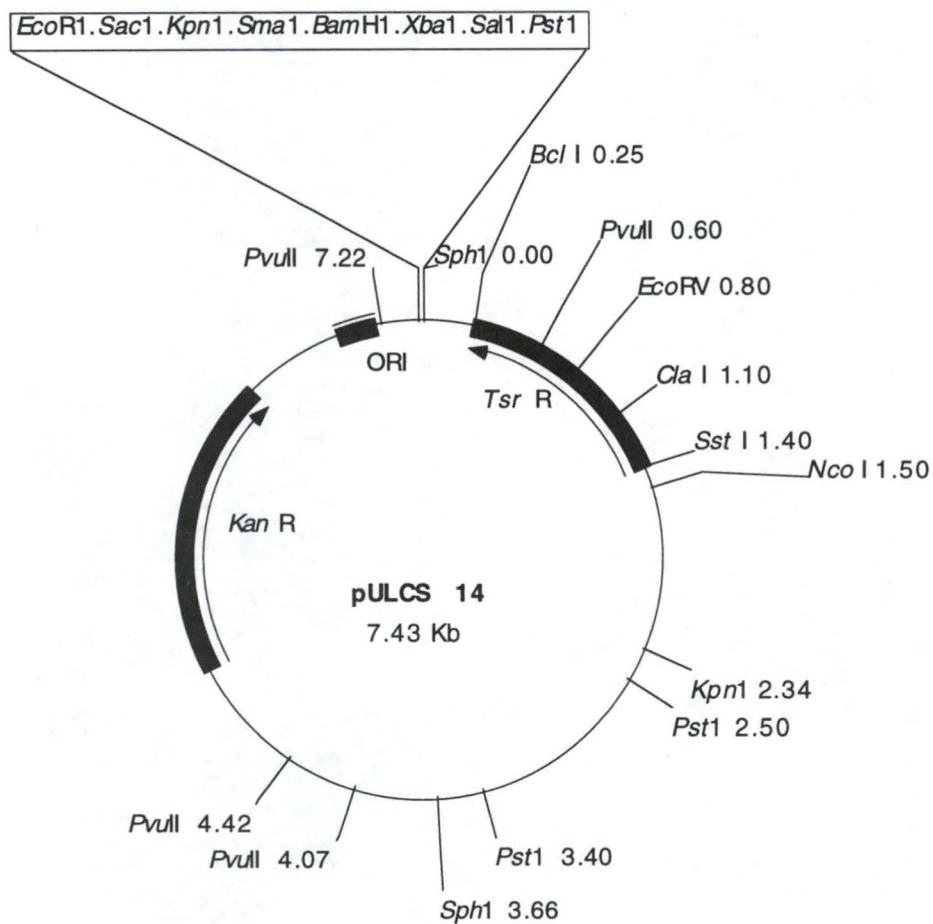


FIGURE IV.2.3. Schéma du plasmide pULCS 14. *Kan R*: Gène de résistance à la kanamycine; *Tsr R*, gène de résistance au thiostrepton; ORI: origine de réplication dans *E.coli*.

IV.2.2. Isolement de fragments des gènes *pab* AB et *pab* L.

Les gènes *pab* AB et *pab* L ont été clonés préalablement par Gil et Macias (40, 90) et leurs séquences ont été analysées. Par digestion avec des enzymes de restriction, un fragment interne de 1617 bp du gène *pab* AB et un autre de 626 bp du gène *pab* L ont été isolés par Macias. (Figure IV.2.4.)

Les fragments ainsi isolés sont insérés chacun dans un plasmide pour assurer leur conservation dans *E.coli*:

-Le fragment interne du gène *pab* AB a été inséré dans le plasmide pIJ2921 (Fig IV.2.5) au site de restriction *Sal* 1 du polylinker. (Figure IV.2.6.). Le nouveau plasmide formé s'appelle pULJM 20.

-Le fragment interne du gène *pab* L est inséré dans le plasmide pIJ2921 au site de restriction *Sma* 1 dont les extrémités, après digestion, sont compatible avec les extrémités obtenues après digestion *Pvu* II (pour isolé le fragment). Le nouveau plasmide formé s'appelle pULJM 42 (Figure IV.2.7.).

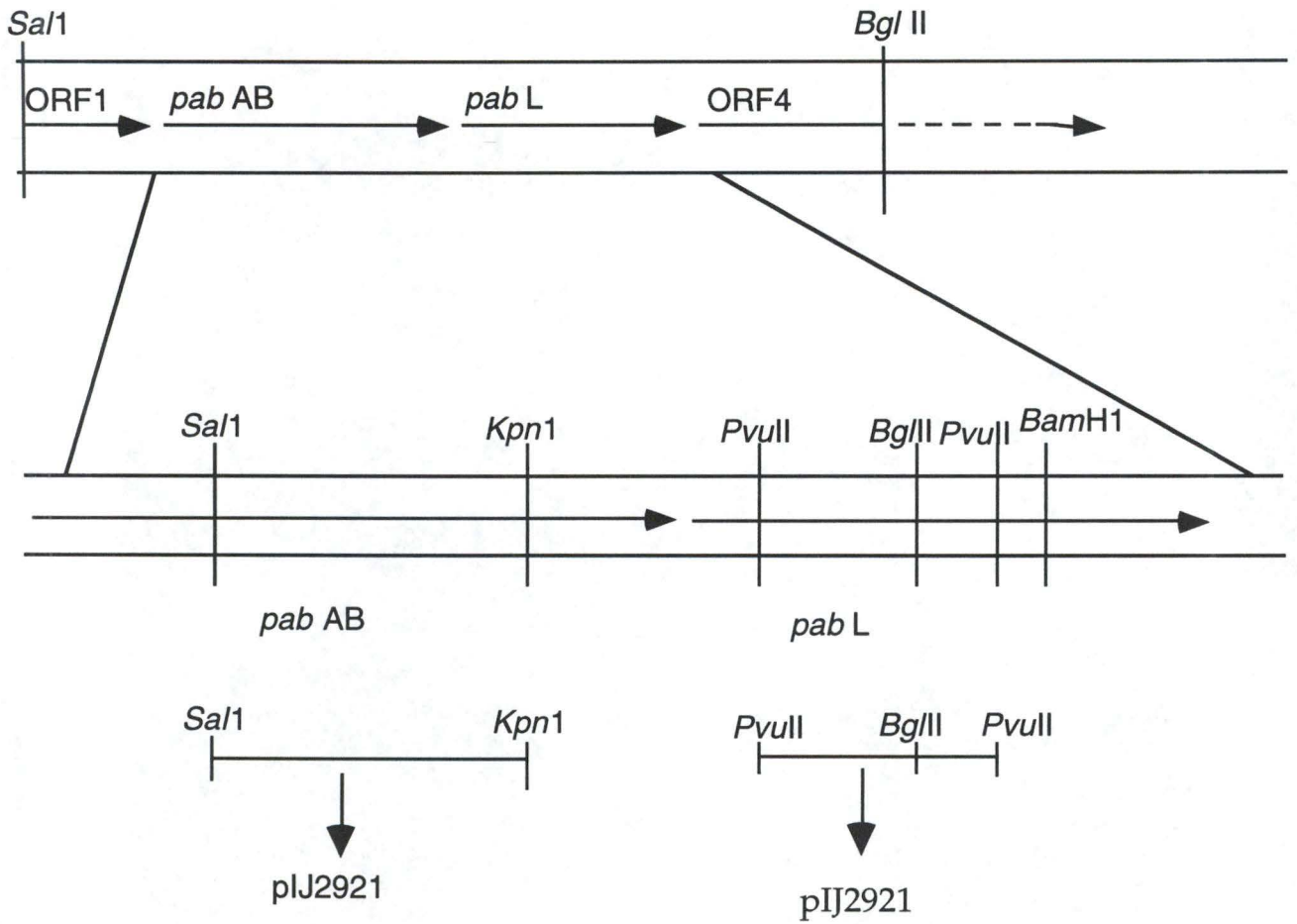


FIGURE IV.2.4. Schéma du cluster de la candidine et position des sites de restrictions utilisés pour isoler les deux fragments internes des gènes *pab AB* et *pab L* qui sont ensuite insérés dans le plasmide pIJ 2921.

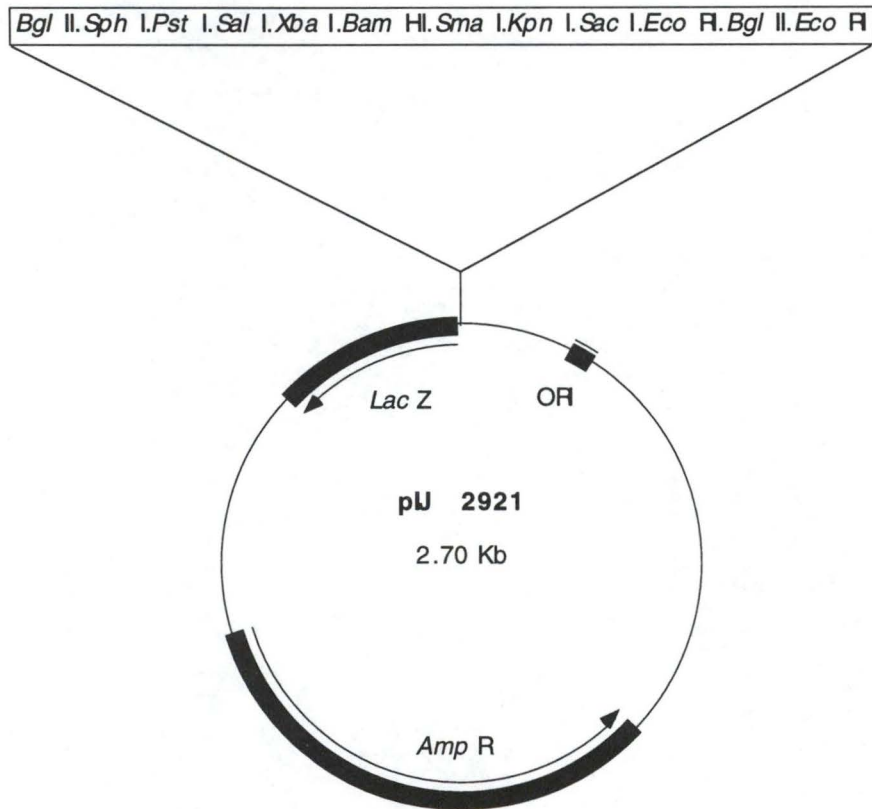


FIGURE IV.2.5. Schéma du plasmide pIJ 2921, comprenant un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp R*), une origine de réplication de *E.coli* (**ORI**) et le gène *Lac Z*.

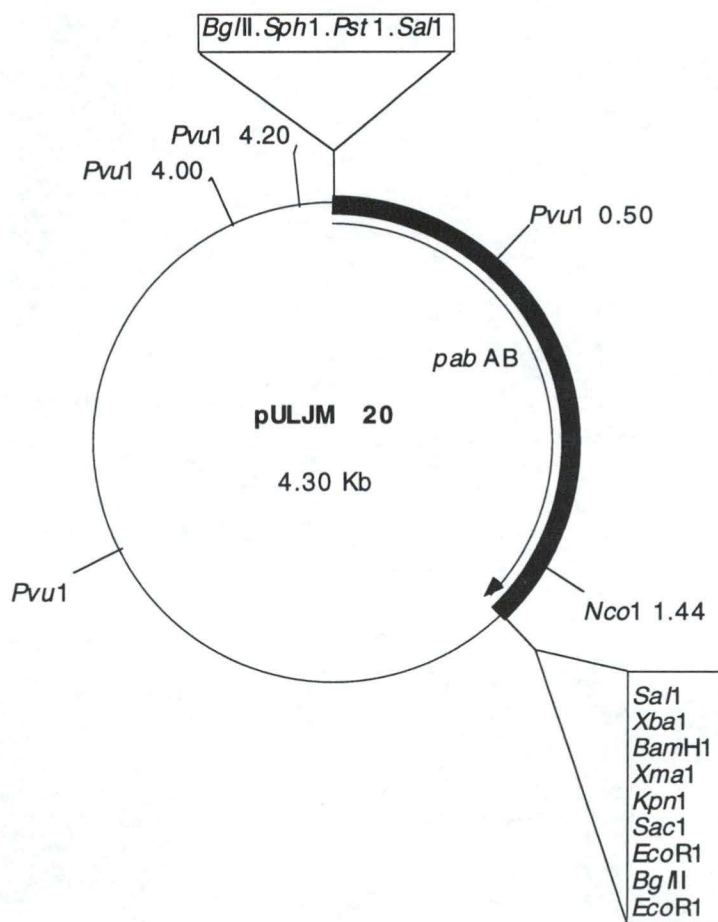


Figure IV.2.6. Plasmide pULJM 20 contenant le fragment interne du gène *pab AB* inséré au site de restriction *Sal I*.

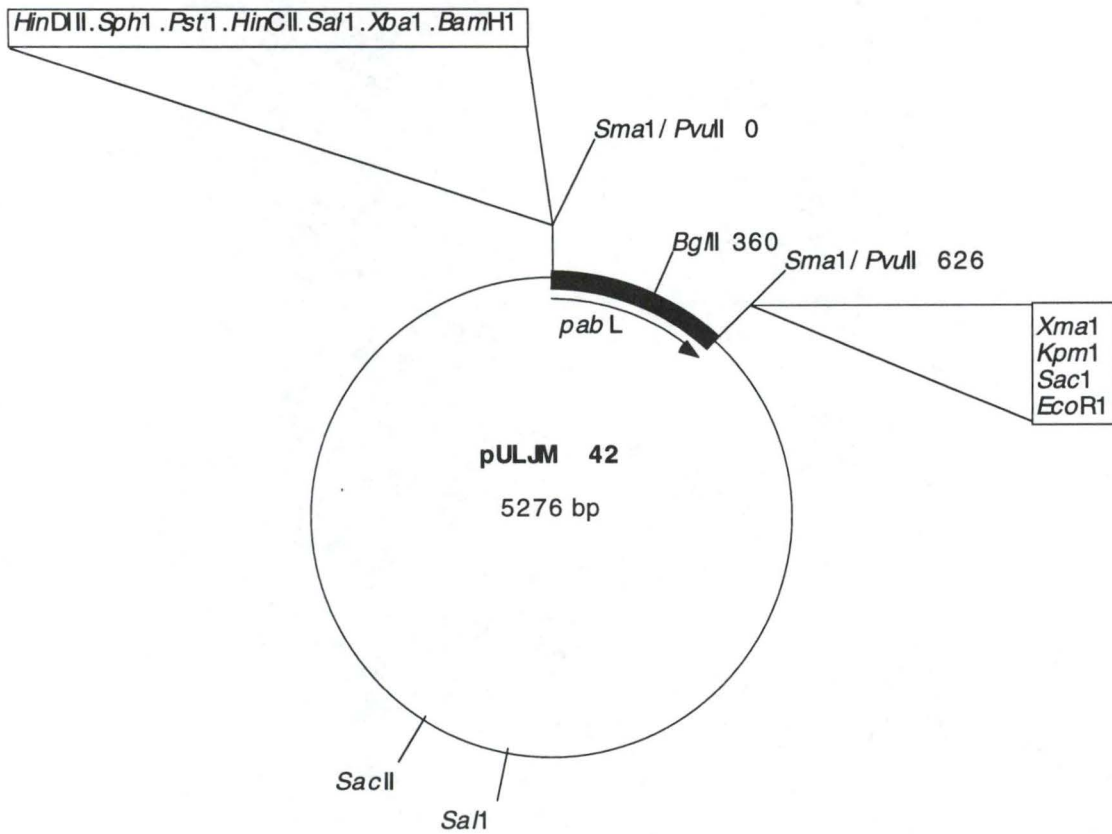


Figure IV.2.7. Plasmide pULJM 42 contenant le fragment interne du gène *pabL* au site de restriction *Sma* 1 du polylinker.

IV.2.3. Le vecteur plasmidique suicide de disruption de *pab* AB.

Pour construire le vecteur pULCS 16, il faut insérer le fragment interne de *pab* AB dans le plasmide suicide pULCS 14. Les différentes étapes de cette construction sont représentées à la figure IV.2.8.

Ces différentes étapes sont:

- 1. Excision du fragment interne de *pab* AB du plasmide pULJM 20 (Fig IV.2.6.) par digestion avec l'enzyme de restrictions *Bgl* II + *Eco* RI
- 2. Migration sur gel d'agarose du mélange de restriction. Contrôle de la présence de la bande de 1,6 kb.
- 3. Récupération du fragment d'ADN par la méthode GENE CLEAN.
- 4. Linéarisation du plasmide pULCS 14 par digestion avec les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI.
- 5. Recircularisation par ligation du fragment de 1,6 kb obtenu de pULJM 20 avec le plasmide pULCS 14 linéarisé.

IV.2.4. Le vecteur plasmidique suicide de disruption de *pab* L

La construction du plasmide pULCS 18 contenant le fragment interne du gène *pab* L se réalise suivant un schéma semblable à l'obtention du plasmide pULCS 16/17 (Figure IV.2.9.).

- 1. Le fragment interne du gène *pab* L est isolé du plasmide pULJM 42 par digestion avec les enzymes de restriction *Eco* RI et *Bam* HI.
- 2. La présence du fragment de 626 bp est contrôlée sur gel d'agarose et il est récupéré par la méthode GENE CLEAN.
- 3. Le plasmide pULCS 14 est linéarisé par restriction *Eco* RI et *Bam* HI.
- 4. Le plasmide pULCS 18 est obtenu finalement par ligation du fragment de 626 bp avec le plasmide pULCS 14 linéarisé.

IV.2.5. Transformation de *Escherichia coli*.

Pour contrôler la validité des constructions et obtenir une grande quantité de celles-ci, on a transformé *E.coli* avec les nouveaux vecteurs. Ceci est possible grâce à la partie pBluescript du plasmide pULCS 14. Les bactéries poussent ensuite toute une nuit en présence de l'antibiotique kanamycine.

Les plasmides sont récupérés par mini-préparation et chargés sur gel d'agarose. Le contrôle est le plasmide pULCS 14. Les plasmides pULCS16 et pULCS 18 migrent moins loin car ils sont plus lourds .

Sur ces plasmides plus lourds sont réalisées plusieurs restrictions, ainsi que sur le plasmide parental pULCS 14 qui sert de contrôle. Les différentes restrictions réalisées sont: *Eco* RI, *Pst* I et *Eco* RI + *Pst* I.

(figure IV.2.10.)

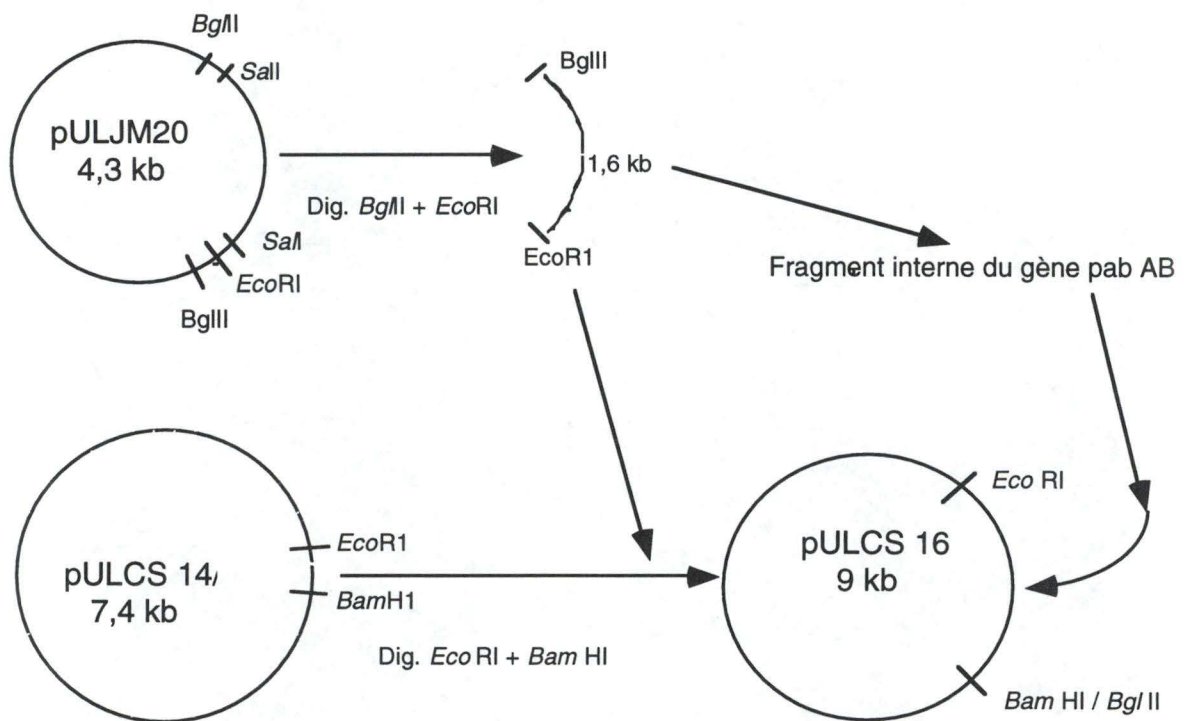


Figure IV.2.8. Schéma des différentes étapes d'obtention du plasmide pULCS 16/17 contenant le fragment interne du gène *pab* AB. Se référer au schémas généraux des plasmides pour plus de détails.

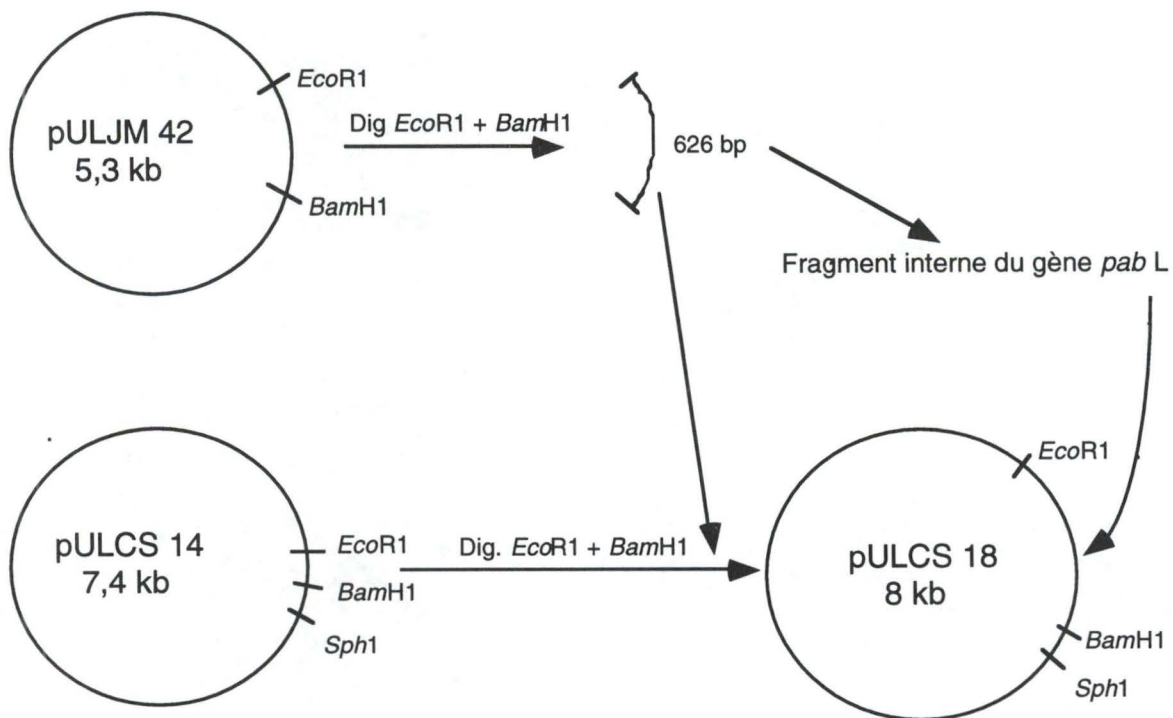


FIGURE IV.2.9. Schéma des différentes étapes pour l'obtention de la construction pULCS 18 contenant le fragment interne du gène *pab L*. Se référer aux schémas généraux des plasmides pour plus de détails.

La restriction *Eco RI* linéarise tout les plasmides (parental et nouvelles constructions), le site étant unique.

La restriction *Pst I* libère 3 morceaux: 2 sont égaux dans tout les cas et se marquent par des bandes à 2,5 et 0,9 kb. La troisième bande, dans le cas du plasmide parental pULCS 14 est de 4 kb. Elle est de 4 kb plus la taille du fragment interne ajouté dans le cas des plasmides pULCS 16 et pULCS 18, ce qui donne respectivement 5,6 et 4,6 kb.

Les restrictions *Eco RI + Pst I* donnent plusieurs fragments dont un qui apparait chez les plasmides pULCS 16 et 18 et pas chez le plasmide parental pULCS 14. Ce fragment correspond au fragment interne allongé légèrement aux deux extrémités par des morceaux du polylinker de pULCS 14. Les trois autres fragments ont une taille de 4; 2,5 et 0,9 kb (Tableau IV.2.1.).

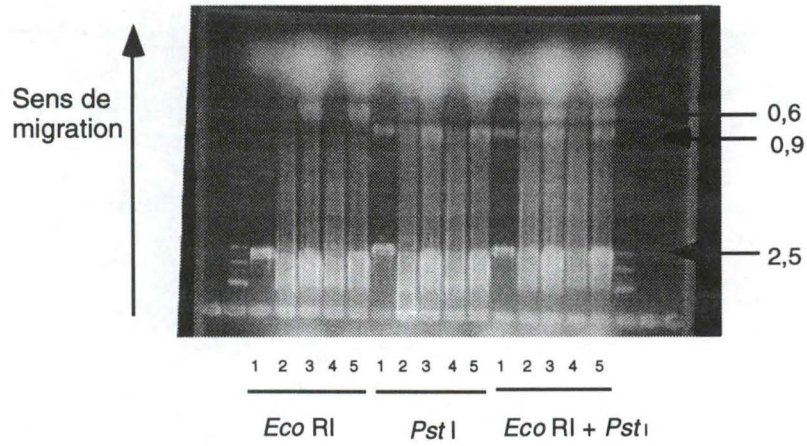


FIGURE IV.2.10. Gel d'agarose des différents plasmides digérés avec les différentes enzymes de restriction. Lignes 1: Plasmide parental pULCS 14; Lignes 2,3,4 et 5: Plasmides pULCS 18 obtenus de quatre colonies différentes. Les deux lignes des extrémités contiennent le phage lambda digéré par *Pst* I.

TABLEAU IV.2.1. Tailles des fragments de restrictions (kb) attendus et obtenus lors de la digestion du plasmide parental pULCS 14 et des constructions pULCS 16 et pULCS 18.

	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI + <i>Pst</i>	<i>Eco</i> RI + <i>Pst</i>
	Tailles	Tailles	Tailles	Tailles	Tailles	Tailles
	attendues	obtenues	attendues	obtenues	attendues	obtenues
	7.43	7.43				
pULCS 14			4	4	4	4
			2.5	2.5	2.5	2.5
			0.9	0.9	0.9	0.9
	9	9				
			5.6	5.6		
pULCS 16					4.0	4.0
			2.5	2.5	2.5	2.5
					1.6	1.6
			0.9	0.9	0.9	0.9
	8	8				
			4.6	4.6		
pULCS 18					4.0	4.0
			2.5	2.5	2.5	2.5
			0.9	0.9	0.9	0.9
					0.6	0.6

Les digestions obtenues étant celles que nous attendions, nous pouvons conclure qu'il s'agit bien des constructions recherchées et que celles-ci pourront être utilisées pour transformer les souches de *Streptomyces griseus*.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

V.I. CONCLUSION.

Une nouvelle méthode de transformation de *Streptomyces* par électroporation est mise au point. Celle-ci est rapide, simple à mettre en oeuvre et efficace. Les paramètres du pulse électrique donnant un taux de transformation élevé (10^5 à 10^6 transformants / μg ADN) et un pourcentage de survie acceptable (80 %) sont de : 25 μF , 10 kV et 400 Ω .

Un nouveau plasmide (pULCS 14), suicide chez *Streptomyces* et capable de se dupliquer chez *E.coli*, a été construit. Il est possible d'insérer dans ce nouveau vecteur des fragments de gènes préalablement clonés. Deux constructions de ce type ont été réalisées: la première contient un fragment du gène pab AB du locus de la candidicine (pULCS 16), le deuxième contient un fragment du gène pab L (pULCS 18), faisant également partie du locus de la candidicine.

Deux tentatives de transformation de *Streptomyces griseus* par électroporation avec ces deux constructions, pULCS 16 et pULCS 18, ont été tentées. Celles-ci n'ont pas donné de résultats, aucune colonie n'ayant poussé après l'addition de l'antibiotique thiostrepton.

V.2. PERSPECTIVES.

En utilisant la technique d'électroporation, transformer les souches de *Streptomyces* productrices de candicidine avec les vecteurs construits. La transformation de ces souches devant amener à la disruption des gènes dont un fragment est porté par le plasmide (Figure V.1.). La sélection des transformants est obtenue par criblage des souches résistantes à l'antibiotique thiostrepton. Le gène de résistance n'est acquis que par les souches transformées. L'analyse du produit formé alors par la souche productrice donnera énormément d'informations sur les étapes de biosynthèse de la candicidine.

Une autre perspective, lointaine dans le cas des *Streptomyces* producteurs de candicidine, mais qui est déjà d'actualité pour des producteurs d'autres antibiotiques (157), est le séquençage complet du locus de la candicidine. Ceci est en cours dans le laboratoire du professeur Gil de l'université de Leon (Espagne). Lorsque ce séquençage sera terminé, on pourra faire de l'ingénierie du métabolisme secondaire en intervertissant, enlevant, additionnant des modules du locus de la candicidine pour créer de nouveaux antibiotiques et/ou améliorer leurs effets et activités dans le cadre de thérapies chez l'homme.

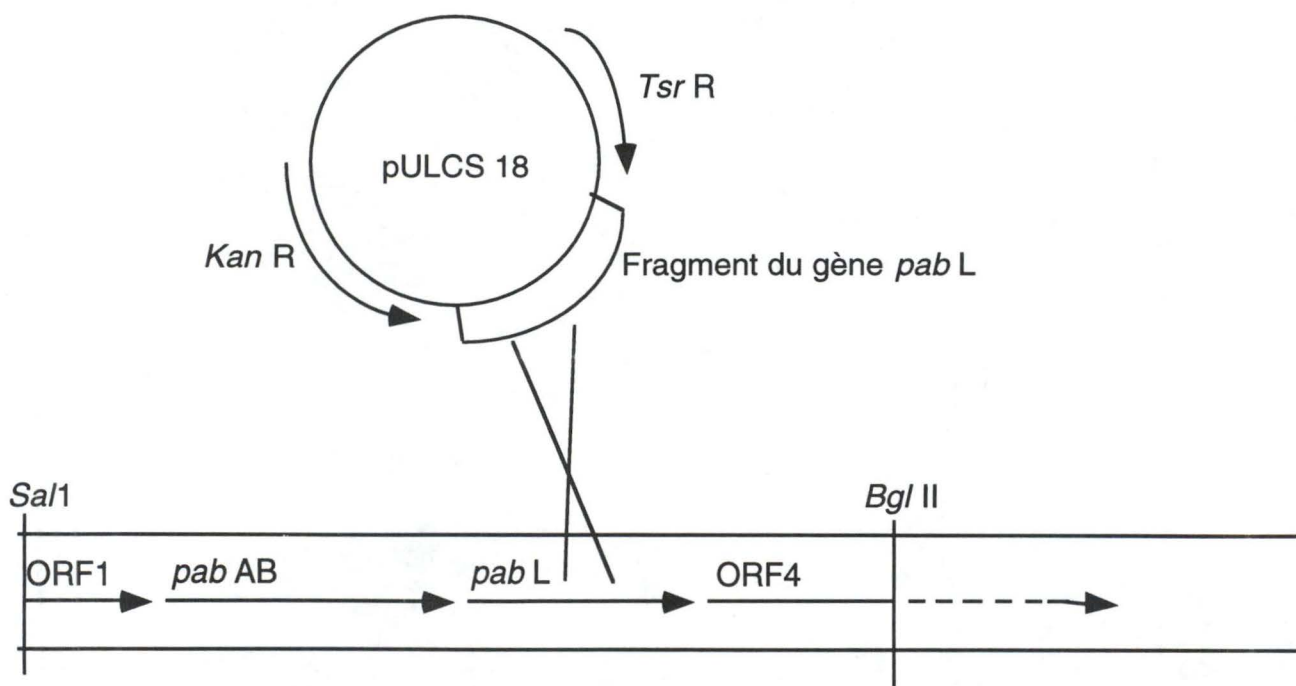


FIGURE V.1. Schéma de la disruption devant être obtenue par recombinaison homologue après transformation par électroporation.

VI. BIBLIOGRAPHIE.

1. **Aguilar A., Hopwood D.A.** Determination of methylnomycin A synthesis by the pSV1 plasmid from *Streptomyces violaceus-ruber* SANK 95570. *J Gen Microbiol.* 1982;**128**:1893-1901.
2. **Altendorf K.H., Gilch B., Lingens F.** Biosynthesis of 4-aminobenzoic acid in *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Letters.* 1971;**16**:95-98.
3. **Andriole V.T., Kravets H.N.** The use of amphotericin B in man. *J Amer Med Ass.* 1962;**180**:269-272.
4. **Antonov P.P., Ivanov I.G., Markov G.G., Benigni R.** Reassociation analysis of DNA in studying the genome size of *Streptomyces*. *Studia Biophysica Berlin.* 1978;**69**:67-74.
5. **Anzai H., Murakami T., Imai S., Satoh A., Nagoaka K., Thompson C.J.** Transcriptional regulation of bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopus*. *J Bacteriol.* 1987;**169**:3482-3488.
6. **Arhin F.F., Vining L.C.** Organization of the genes encoding p-aminobenzoic acid synthetases from *Streptomyces lividans*. *Gene.* 1993;**126**:129-133.
7. **Asturias J.A., Liras P., Martin J.F.** Phosphate control of the *pab* S gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene.* 1990;**93**:79-84.
8. **Asturias J.A., Martin J.F., Liras P.** Biosynthesis and phosphate control of candicidin by *Streptomyces acrimycini* J12236 : effect of amplification of the *pab* AB gene. *J Ind Microbiol.* 1994;**13**:183-189.
9. **Aszalos A.** Differential potentiation by nystatin on the effect of antibiotics on yeast and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975;**7**:754-757.
10. **Baltz R.H., Seno E.T.** Properties of *Streptomyces fradiae* mutants blocked in biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;**20**:214-225.
11. **Belousova I.I., Lishnvsckaya E.B., Elgari R.E.** Incorporation of radioactive precursors into levorin and fatty acids by *Actinomyces levoris*. *Antibiotiki.* 1971;**16**:184-187.
12. **Birch A.J., Holzapfel C.W., Rickards R.W., Ojerassi C., Suzuki M., Westley J., Dutcher J.D., Thomas R., Nistatin V.** Biosynthetic definition of some structural features. *Tetrahedron Lett.* 1964;1485-1490.
13. **Bu'Lock J.D.** Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. *The Filamentous Fungi.* 1975;**1**:33-58.
14. **Buchanan R.E.** Studies on the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *J Bacteriol.* 1917;**2**:155-164.

15. **Burkholder P.R.** Cooperation and conflict among primitive organisms. *Am Sci.* 1952;**40**:601-631.
16. **Bérdy J.** Recent developments of antibiotics research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv Appl Microbiol.* 1974;**18**:309-406.
17. **Campelo A.B.** . *Personnal communication.* 1995;
18. **Chater K.F.** Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial Development.* 1984;89-115.
19. **Chater K.F.** Sporulation in *Streptomyces*. *Regulation of Prokaryotic Development.* 1989;
20. **Chater K.F., Merrick M.J.** *Streptomyces.* *Developmental Biology of Prokaryotes.* 1979;93-114.
21. **Cortes J., Haydock S.H., Roberts G.A., Bevitt D.J., Lewis P.F.** An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature.* 1990;**348**:176-178.
22. **Criado L.M., Martin J.F., Gil J.A.** The *pab* gene from *Streptomyces griseus*, encoding p-aminobenzoic acid synthases, is located between genes possibly involved in candididin biosynthesis. *Gene.* 1993;**126**:135-139.
23. **Cundliffe E.** How antibiotics-producing organisms avoid suicide. *Ann Rev Microbiol.* 1989;**43**:207-233.
24. **Demain A.L.** Why mode of action studies ? *Chem Technol.* 1975;**5**:287-289.
25. **Demain A.L.** Do antibiotics function in nature ? *Search.* 1980;**11**:148-151.
26. **Demain A.L.** Biology of antibiotic formation. *Drugs and Pharmaceutical Sciences Vol 22 Biotechnology of Industrial Antibiotics.* 1984;33-42.
27. **Demain A.L., Piret J.M.** Relationship between antibiotic biosynthesis and sporulation. *Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism.* 1979;183-188.
28. **Demain A.L., Piret J.M.** Why secondary metabolism ? *Microbiology.* 1981;
29. **Edman J.C., Goldstein A.L., Erbe J.G.** Para-aminobenzoate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a bifunctional enzyme. *Yeast.* 1993;**9**:669-675.
30. **Enquist L.W., Bradley S.G.** Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces venezuelae*. *Dev Ind Microbiol.* 1971;**12**:225-236.

31. **Essar D.W., Eberly L., Hadero A., Crawford I.P.** Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa* : interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol.* 1990;**172**:884-900.
32. **Feingold D.S.** The action of amphotericin B on *Mycoplasma laidlawii*. *Biochem Biophys Res Comm.* 1965;**19**:261-267.
33. **Finkelstein A., Holz I.** Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *Membranes.* 1973;**2**:377-408.
34. **Fishman S.E., Rosteck P.R.J., Hersberger C.L.** A 2,2 kilobase repeated DNA segment is associated with DNA amplification in *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol.* 1985;**161**:199-206.
35. **Gale E.F., Cundliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H., Waring M.J.** The Molecular Basis of Antibiotics Action. *Wiley, London.* 1981;
36. **Ghisalba O., Fuhrer H., Richter W.J., Moss S.** A genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin chromophore in *Nocardia mediterranei*. III. Isolation and identification of an early aromatic ansamycin precursor containing the seven-carbon amino starter-unit and three initial acetate/propionate-unit of the ansa chain. *J Antibiot.* 1981;**34**:58-63.
37. **Ghosh B.K.** Action of an antifungal antibiotic nystatin on the protozoa *Leishmania donovani*. IV. Studies on the cytological and cytochemical change. *Ann Biochem and Expt Med (Calcuta).* 1963;**23**:193-200.
38. **Gibson F., Gibson M., Cox G.B.** The biosynthesis of p-aminobenzoic acid from chorismic acid. *Biochem Biophys Acta.* 1964;**82**:637-638.
39. **Gil J.A., Criado L.M., Alegre T., Martin J.F.** Use of a cloned gene involved in candididin production to discover new polyene producer *Streptomyces* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1990;**58**:15-18.
40. **Gil J.A., Hopwood D.A.** Cloning and expression of a p-aminobenzoic acid synthetase gene from the candididin producer *Streptomyces griseus*. *Gene.* 1983;**25**:119-132.
41. **Gil J.A., Liras P., Naharro G., Villanueva J.R., Martin J.F.** Regulation by aromatic amino acids of the biosynthesis of candididin by *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol.* 1980;**118**:189-195.
42. **Gil J.A., Naharro G., Villanueva J.R., Martin J.F.** Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol.* 1985;**131**:1279-1287.
43. **Gladek A., Zakrzewska J.** Genome size of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 1984;**24**:73-76.

44. **Goncharoff P., Nichols B.P.** Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *pab* B indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate and anthranilate synthetases. *J Bacteriol.* 1984;**159**:57-62.
45. **Gottlieb D., Carter M.E., Sloneker J.H., Wu B.C., Gandy E.** Mechanism of inhibition of fungi by filipine. *Phytopatology.* 1961;**51**:321-330.
46. **Gouge T.H., Andriole V.T.** Experimental model of amphotericin B, nephrotoxicity with renal tubular acidosis. *J Lab Clin Med.* 1971;**78**:713-724.
47. **Green J.M., Nichols B.P.** p-Aminobenzoate biosynthesis in *Escherichia coli*. Purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of *pab* C. *J Biol Chem.* 1991;**266**:12972-12975.
48. **Hamilton-Miller J.M.T** Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol Rev.* 1973;**37**:166-196.
49. **Hardison C., Manzanal M.B.** Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* 1976;**127**:1443-1454.
50. **Harris J.E., Chater K.F., Bruton C.J., Piret J.M.** The restriction mapping of *c* gene deletions in *Streptomyces* bacteriophage fC31 and their use in cloning vector development. *Gene.* 1983;**22**:167-174.
51. **Helboe P., Thomsen M., Hansen S.H.** Improved high-performance liquid chromatographic method for the comparison of heptaene macrolide antibiotics. *J Chromatogr.* 1980;**189**:249-254.
52. **Henderson G., Krygsman P., Liu C.J., Davey C.C., Malek L.T.** Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 1987;**169**:3778-3784.
53. **Hopwood D.A.** Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicor*. *Bacteriol Rev.* 1967;**31**:373-403.
54. **Hopwood D.A.** Antibiotics : opportunities for genetic manipulation. *Phil Trans R Soc London.* 1989;**324**:549-562.
55. **Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Jansen G.R., Malpartida F., Smith C.P.** Regulation of gene expression in antibiotic producing *Streptomyces*. *Regulation of gene expression-25 years.* 1986;251-276.
56. **Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrempf H.** *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual.. The John Innes Foundation.* 1985;
57. **Hopwood D.A., Glauert A.M.** Observations on the chromatinic bodies of *Streptomyces coelicor*. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960;**8**:257-265.
58. **Hopwood D.A., Glauert A.M.** The fine structure of *Streptomyces coelicor*. II. The nuclear material. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960;**8**:267-278.

59. **Hopwood D.A., Kieser T., Lydiate D.J., Bibb M.J.** *Streptomyces* plasmids : their biology and use as cloning vectors. *Antibiotic-producing Streptomyces*. 1985;
60. **Hopwood D.A., Sherman D.H.** Molecular genetics of polyketide and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Ann Rev Genet*. 1990;**24**:37-66.
61. **Hu H., Bao K., Zhou X., Hopwood D.A., Kieser T., Deng Z.** Repeated polyketide synthase modules involved in the biosynthesis of a heptaene macrolide by *Streptomyces* sp. FR-008. *Mol Microbiol*. 1994;**14**:163-172.
62. **Huang M., Gibson F.** Biosynthesis of 4-aminobenzoate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1970;**102**:767-773.
63. **Ikeda H., Kotaki H., Omura S.** Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol*. 1987;**169**:5615-5621.
64. **Jones E.W., Fink G.H.** Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. 1982;
65. **Jones G.H., Hopwood D.A.** Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces lividans* by cloned DNA sequences from *Streptomyces antibioticus*. *J Biol Chem*. 1984;**259**:14158-14164.
66. **Kane J.F., O'Brien H.D.** p-Aminobenzoate synthase from *Bacillus subtilis*: amido transferase composed of nonidentical subunits. *J Bacteriol*. 1975;**123**:1131-1138.
67. **Kaplan J.B., Nichols B.P.** Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *pab A* and its evolutionary relationship to *trp (G)D*. *J Mol Biol*. 1983;**168**:451-468.
68. **Kase H., Fujita H., Nakamura J., Hashizume K., Goto J., Kubo K., Shuto K.** MY-336a, a novel b-adrenergic receptor antagonist produced by *Streptomyces gabonae*. *J Bacteriol*. 1986;**39**:354-363.
69. **Keim G.R., Poutsika J.W., Kirpan J., Keysser C.H.** Amphotericin B methyl ester hydrochloride and amphotericin B : comparative acute toxicity. *Science*. 1989;**179**:584-585.
70. **Khan M.R., Williams S.T.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biol biochem*. 1975;**7**:345-348.
71. **Kinsky S.C.** Comparative responses of mammalian erythrocytes and microbial protoplasts to polyene antibiotic and vitamin A. *Arch Biochem Biophys*. 1962;**102**:180-188.

72. **Kinsky S.C., Auruch J., Permutt M., Rogers H.B., Schonder A.A.** The lytic effects of polyene antifungal antibiotics on mammalian erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962;9:503-507.
73. **Kinsky S.C., Demel R.A., Van Deenen L.L.M.** Further studies on the hemolytic action of filipin and derivatives. *Biochem Biophys Acta.* 1967;135:835-843.
74. **Kutzner H.G.** . *The Prokaryotes.* 1981;2028-2082.
75. **Lampen J.O., Arnow P.M.** Differences in action of large and small polyene antifungal antibiotics. *Bull Res Counc Isr.* 1963;2:286-291.
76. **Lampen J.O., Gill J.W., Arnow P.M., Magana-Plaza I.** Inhibition of the *Peuropneumoniae* like organism *Mycoplasma gallisepticum* by certain polyene antifungal antibiotics. *J Bacteriol.* 1963;86:945-949.
77. **Lampen J.O., Mc Lellan V.L., El-Nabeeb M.A.** Antibiotic and fungal physiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1965;1006-1015.
78. **Lanz T., Tropf S., Marnier F.J., Schroder J., Schroder G.** The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J Biol Chem.* 1991;266:9971-9976.
79. **Lechevalier H., Acker R.F., Corke C.T., Haenseler C.M., Waksman S.A.** Candicidin, a new antifungal antibiotic. *Mycologia.* 1953;45:155-171.
80. **Lechevalier H.A., Lechevalier M.P.** Biology of the actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.* 1967;21:71-100.
81. **Lechevalier M.P.** . *Actinomycetes.* 1981;159-164.
82. **Light R.J.** Enzymic studies on the polyketide biosynthesis. *J Agric Food Chem.* 1970;18:260-267.
83. **Linke H.A.B, Mechlinski W., Schaffner C.P.** Production of amphotericin B-¹⁴C by *Streptomyces nodosus*. Fermentation and preparation of amphotericin B-¹⁴C-methyl-ester. *J Antibiot.* 1974;27:155-160.
84. **Liu C.M., Mc Daniel L.E., Schaffner C.P.** Studies on candicidin biosynthesis. *J Antibiot.* 1972;25:116-121.
85. **Liu C.M., Mc Daniel L.E., Schaffner C.P.** Fungimycin, biogenesis of its aromatic moiety. *J Antibiot.* 1972;25:187-188.
86. **Locci R.** *Streptomyces* and related genera. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Section 29.* 1989;
87. **Long C.M., Virolle M.J., Chang S.Y., Bibb M.J.** α -amylase gene of *Streptomyces limosus* : nucleotide sequence, expression motifs and amino

acid sequence homology to mammalian and invertebrate α -amylases. *J Bacteriol.* 1987;**169**:5745.

88. **Lüderitz O., Staub A.M., Westphal O.** Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related enterobacteriaceae. *Bacteriol Rev.* 1966;**30**:192-255.

89. **MacNeil D.J., Occi J.L., Gewain K.M., MacNeil T., Gibbons P.H., Ruby C.L., Danis S.J.** Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase. *Gene.* 1992;**115**:119-125.

90. **Macias J.R.** . *personnal communication.* 1995;

91. **Malpartida F., Hallam S.E., Kieser H.M., Motamedi H., Hutchinson C.R., Butler M.J., Sugden D.A., Warren M., Mc Killop C., Bailey C.R., Humphreys G.O., Hopwood D.A.** Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthesis genes. *Nature.* 1987;**325**:818-821.

92. **Malpartida F., Hopwood D.A.** Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature.* 1984;**309**:462-464.

93. **Manwaring D.G., Rickards R.W., Gandiano G., Nicolella V.** The biosynthesis of the macrolide antibiotic lucensomycin. *J Antibiot.* 1969;**22**:545-550.

94. **Martin J.F.** Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Ann Rev Microbiol.* 1977;**31**:13-38.

95. **Martin J.F.** Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Advances in Biochemical Engineering.* 1977;**6**:105-127.

96. **Martin J.F., Demain A.L.** Effect of exogenous nucleotides on the candicidin fermentation. *Can J Microbiol.* 1977;**23**:1334-1339.

97. **Martin J.F., Demain A.L.** Control of antibiotics biosynthesis. *Microbiol Rev.* 1980;**44**:230-251.

98. **Martin J.F., Liras P.** Rapid incorporation of precursors into candicidin by resting-cells of *Streptomyces griseus*. *J Antibiot.* 1976;**29**:1306-1309.

99. **Martin J.F., Liras P.** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann Rev Microbiol.* 1989;**43**:173-206.

100. **Martin J.F., Marcos A.T., Martin A., Asturias J.A., Liras P.** Phosphate control of antibiotic biosynthesis at the transcriptional level. *Phosphate in Microorganisms Cellular and Molecular Biology.* 1994;

101. **Martin J.F., Mc Daniel L.E.** Candihexin polyene macrolide complex: physicochemical characterization and antifungal activities of the single components. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975;**8**:200-208.
102. **Martin J.F., Mc Daniel L.E.** Specific inhibition of candidin biosynthesis by the lipogenic inhibitor cerulenin. *Biochem Biophys Acta.* 1975;**411**:186-194.
103. **Martin J.F., Mc Daniel L.E.** Biosynthesis of candidin by phosphate limited resting cells of *Streptomyces griseus*. *Eur J Appl Microbiol.* 1976;**3**:135-144.
104. **Matsushay M., Strominger J.L.** Thymidine diphosphate 4-acetamido-4,6-dideoxy-hexoses. I. Enzymatic synthesis by strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1966;**239**:2454-2463.
105. **Mayfield C.I., Williams S.T., Ruddick S.M., Hatfield H.L.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol biochem.* 1972;**4**:79-91.
106. **Mc Vittie A.** Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicor*. *J Gen Microbiol.* 1974;**81**:291-302.
107. **Mendez C., Brana A.F., Manzanal M.B., Hardisson C.** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol.* 1985;**31**:446-450.
108. **Moat A.G., Peters N., Srb A.M.** Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. *J Bacteriol.* 1965;**77**:673-677.
109. **Okada H., Mukai H., Inouye Y., Nakamura S.** Biological properties of streptonigrin derivatives. II. Inhibition of reverse transcriptase inhibitors. *J Bacteriol.* 1986;**39**:306-308.
110. **Orkin L.A.** Efficacy of candidin in benign prostatic hypertrophy. *Urology.* 1974;**4**:80-84.
111. **Ortman R., Matern U., Grisebach H., Stadler P., Sinnwell V., Paulsen H.** NADH-dependent formation of thymidine diphosphodihydrostreptose from thymidine diphospho-D-glucose in a cell-free extract from *Streptomyces griseus* and its correlation with streptomycin biosynthesis. *J Biochem.* 1974;**43**:265.
112. **Perlman R.A., Semar J.B.** Preparation of amphotericin B-¹⁴C. *Biotech Bioeng.* 1965;**7**:133-137.
113. **Pissowotzki K., Mansouri K., Piepersberg W.** Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. *Mol Gen Genet.* 1991;**231**:113-123.

114. **Ragni G., Szybalski W., Borowski E., Schaffner C.P.** N-acetylcanidicin a water-soluble polyene antibiotic for fungal prophylaxis and decontamination. *Antibiot Chemother.* 1961;**11**:797-799.
115. **Rebollo A.** Expression of the *pab* gene of *Streptomyces griseus* IMRU3570: genetic and biochemical studies. *Ph D Thesis.* 1987;
116. **Sarin P.S.** Molecular pharmacologic approaches to treatment of AIDS. *A Rev Pharmac.* 1988;**28**:411-428.
117. **Schaffner C.P., Mechlinski W.** Polyene macrolide derivatives. II. Physical-chemical properties of polyene macrolide esters and their water soluble salts. *J Bacteriol.* 1972;**25**:259-260.
118. **Schauer A., Ranes M., Santamaria R., Guijarro J., Lawlor E., Méndez C., Chater K., Losick R.** Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicor.* *Science.* 1988;**240**:768-772.
119. **Schrempf H.** Genetic instability : amplification, deletion and rearrangement within *Streptomyces* DNA. *Microbiology.* 1985;436-440.
120. **Schroeder F., Holland J.F., Bieber L.L.** Fluorimetric evidence for the binding of cholesterol to the filipin complex. *J Antibiot .* 1971;**24**:846-849.
121. **Seno E.T., Bruton C.J., Chater K.F.** The glycerol utilization operon of *Streptomyces coelicor* : genetic mapping of *gyl* mutations and their analysis of cloned *gyl* DNA. *Mol Gen Genet.* 1984;**193**:119-128.
122. **Sermonti G., Lanfaloni L., Micheli M.R.** Where are the antibiotic producing genes? *Riv Biol.* 1982;**75**:67-85.
123. **Seto H., Sasaki T., Imai S., Tsuruoka T., Ogawa H., Satoh A., Inouye S., Niida T., Otake N.** Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 2. Isolation of the first natural products with a C-P-H bond and their involvement in the C-P-C bond formation. *J Bacteriol.* 1983;**36**:96-98.
124. **Smith C.L., Econome J.G., Schutt A., Kico S., Cantor C.R.** A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science Wash.* 1987;**236**:1448-1453.
125. **Stockmann M., Piepersberg W.** Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;**90**:185-190.
126. **Sukatsch D.A., Neseemann G.** Diauxic phenomenon in flavomycin fermentation. *Abstr Annu Met Am Soc Microbiol.* 1977;**46**:252.
127. **Taber W.A.** Evidence for the existence of acid-sensitive actinomycetes in soil. *Can J Microbiol.* 1960;**6**:503-514.

128. **Takiguchi Y., Mishima H., Okuda M., Terao M., Aoki A., Fukuda R.** Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics : fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Bacteriol.* 1980;**33**:1120-1127.
129. **Teng C.Y.P., Ganem B., Doktor S.Z., Nichols B.P., Bhatnagar R.K., Vining L.C.** Total synthesis of 4-amino-4-deoxychorismic acid: a key intermediate in the biosynthesis of p-aminobenzoic acid and L-(p-aminophenyl)alanine. *J Amer Chem Soc.* 1985;**107**:5008-5009.
130. **Thirumalachar M.J., Menon S.K., Bhatt V.V.** Hamycin, a new antifungal antibiotic. *Hindustan Ant Bull.* 1961;**3**:136-138.
131. **Tohyama H., Okami Y., Umezawa H.** Nucleotide sequence of the streptomycin-phosphotransferase and amidinotransferase genes from *Streptomyces griseus*. *Nucl Acids Res.* 1987;**15**:1819-1833.
132. **Umezawa H., Imoto M., Sawa T., Isshiki K., Matsuda N., Uchida T., Linuma H., Hamada M., Takeuchi T.** Studies on a new epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH453-hf3. *J Antibiot.* 1986;**39**:170-173.
133. **Vandamme E.J.** Antibiotic seach and production: an overview. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences Vol 22 Biotechnology of Industrial Antibiotics.* 1984;3-31.
134. **Vara J., Hutchinson C.R.** Purification of thymidine-diphospho-D-glucose 4,6-dehydratase from an erythromycin producing strain of *Saccharomyces erythrae* by high resolution liquid chromatography. *J Biol Chem.* 1988;**263**:14992-14995.
135. **Vara J., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.G., Donadio S., Hutchinson R.** Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythrae* (*Streptomyces erythraeus*). *J Bacteriol.* 1989;**171**:5872-5881.
136. **Verma N., Reeves P.** Identification and sequence of *rfb* S and *rfb* E, which determine antigenic specificity of group A and group D salmonellae. *J Bacteriol.* 1989;**171**:5694-5701.
137. **Waksman S.A., Henrici A.T.** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 1943;**46**:337-341.
138. **Waksman S.A., Lechevalier H.A., Schaffner C.P.** Candicidin and other polyenic antifungal antibiotics. *Bull World Health Organ.* 1965;**33**:219-226.
139. **Weinberg E.D.** Biosynthesis of secondary metabolites: Roles of trace metals. *Adv Microbiol Physiol.* 1970;**4**:1-43.
140. **Wildermuth H., Hopwood D.A.** Septation during sporulation in *Streptomyces coelicor*. *J Gen Microbiol.* 1970;**60**:51-59.

141. **Williams S.T.** *Streptomyces* in the soil ecosystem. *Nocardia and Streptomyces*. 1978;137-144.
142. **Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sackin M.J.** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol*. 1983;129:1743-1814.
143. **Williams S.T., Sharples G.P., Bradshaw R.M.** . *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. 1973;113-126.
144. **Wyk P., Reeves P.** Identification and sequence of the gene for abequeose synthase, which confers antigenic specificity on group B salmonellae: homology with galactose epimerase. *J Bacteriol*. 1989;171:5687-5693.
145. **Young F.E., Wilson G.A.** *Bacillus subtilis*. *Handbook of Genetics Vol I*. 1974;69-114.
146. **Zielinski J., Borowy-Borowski H., Golik J., Gumienak J., Ziminski T., Kolodzi-Ejczyk P., Pawlak J., Borowski E.** The structure of levorin A₂ and candicidin D. *Tetrahedron Lett*. 1979;20:1791-1794.
147. **Zygmunt W.A.** Intracellular loss of potassium in *Candida albicans* after exposure to polyene antifungal antibiotics. . *Appl Microbiol*. 1966;14:953-956.
148. **Tompson C.J., Ward J.M., Hopwood D.A.** DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature* 1980;286:525-527.
149. **Miller J.H.** *Experiments in Molecular Genetics*. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
150. **Hanahan D.** Techniques for transformation of *E.coli*. En: *DNA cloning. Vol. 1. A practical approach*. 1985; 109-135. Glover D.M. (ed). IRL Press, Oxford, Washington D.C.
151. **Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L.** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1972;69:2110-2114.
152. **Mandel M., Higa A.** Calcium dependant bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol*. 1970;53:159-162.
153. **Southern E.M.** Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzimol*. 1979;68:152-176.
154. **Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 1982. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
155. **Pigac J., Schrempf H.** A simple method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomyces by electroporation. *Appl. Env. Microbiol*. 1995;61:352-356.