Table des matières

I. Introduction. **1**

I.1. Généralités sur les *Streptomyces*..... 1

I.1.1. Taxonomie des actinomycètes..... 1

I.1.2. Le genre *Streptomyces* : adaptations génétiques à l'immobilité et la vie dans le sol..... 2

I.1.2.1. Ecologie des *Streptomyces*..... 2

I.1.2.2. Cycle de vie et différenciation morphologique..... 6

I.1.2.3. Métabolites secondaires et différenciation physiologique..... 11

I.2. *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche modèle pour l'étude physiologique des *Streptomyces*.... 14

I.2.1. *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche modèle pour l'étude du métabolisme primaire des *Streptomyces*..... 18

I.2.2. *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche modèle pour l'étude de l'induction du métabolisme secondaire des *Streptomyces*..... 21

I.2.3. *Streptomyces coelicolor* A3(2), souche modèle pour l'étude de l'induction de la différenciation morphologique des *Streptomyces*..... 24

I.3. Travaux antérieurs sur la relation entre l'utilisation de sources de carbone et l'induction du développement chez *S. coelicolor*..... 32

I.3.1. Thématique de recherche..... 32

I.3.2. Rôle du régulateur DasR chez *S. coelicolor*..... 32

I.4. Objectifs de la thèse..... 41

II. Résultats.

II.1 – PREDetector. **43**

II.1.1. Nécessité et ambitions de la prédiction d'un régulon..... 43

II.1.1.1. Utilisation des matrices de scores..... 44

II.1.1.2. Les programmes informatiques de prédiction des régulons..... 45

II.1.2. Présentation du programme PREDetector..... 48

II.1.2.1. PREDetector partie I : création des matrices de scores..... 48

II.1.2.2. PREDetector partie II : prédiction des régulons..... 49

II.1.2.3. PREDetector - Estimation de la fiabilité des prédictions..... 54

II.1.3. Conclusion..... 57

II.2 – Définition du régulon DasR chez *Streptomyces coelicolor.* **59**

II.2.1. Optimalisation de la matrice de prédiction du régulon DasR..... 60

II.2.1.1. Choix des *dre* utilisés pour construire la matrice de prédiction du régulon DasR..... 62

II.2.1.2. Fixation des paramètres de prédiction du régulon DasR chez *Streptomyces coelicolor*.... 66

II.2.1.3. Qualité et fiabilité de la matrice DasR2009..... 66

II.2.1.3.1. Estimation de l'optimalisation apportée à la matrice de prédiction du régulon DasR.... 66

II.2.1.3.2. Evolution de la fiabilité des prédictions..... 69

II.2.1.3.3. Evolution du nombre de cibles potentielles prédites..... 70

II.2.2. Le régulon DasR chez *Streptomyces coelicolor*..... 72

II.2.2.1. Nombre de cibles potentiellement régulées par DasR identifiées par la prédiction et localisation génomique de celles-ci..... 72

II.2.2.2. Analyse fonctionnelle du régulon DasR..... 80

II.2.3. Détermination du conservon DasR par analyse comparative des régulons DasR des *Streptomyces*..... 102

II.2.3.1. Analyse fonctionnelle des régulons DasR chez les *Streptomyces*..... 103
II.2.3.2. II.2.3.2.Le conservon DasR des *Streptomyces.*..... 106
II.3 : Implication de *dasA* dans le développement de *Streptomyces coelicolor.* 113
II.3.1. Le gène *dasA* est une cible majeure de DasR..... 114
II.3.2. Rôle de *dasA* dans le développement de *S. coelicolor*..... 117
II.3.2.1. Inactivation de *dasA*..... 117
II.3.2.2. Etude de l'expression transcriptionnelle de *dasA*..... 120
II.3.2.2.1. Analyse du promoteur de *dasA*..... 120
II.3.2.2.2. L'expression de *dasA* est induite par la chitine et réprimée par la GlcNAc..... 122
II.3.2.3. *dasA* est impliqué dans le développement de *S. coelicolor*..... 130
II.3.2.3.1. Caractérisation du phénotype morphologique du mutant SAF3..... 130
II.3.2.3.2. Effet de la GlcNAc et de la chitine sur le développement des *Streptomyces*..... 136
II.3.3. La protéine DasA serait impliquée dans la régulation du système chitinolytique..... 142
II.3.3.1. La souche SAF3 possède une activité chitinolytique globale élevée..... 142
II.3.3.2. Modèle suggérant une connexion entre la protéine DasA et le système ChiSR impliqué dans l'induction du système chitinolytique..... 144
II.3.4. Discussion..... 146
III. Conclusion et perspectives. 149
IV. Publications.
V. Matériel & Méthodes. 153
V.1. Outils informatiques utilisés..... 153
V.1.1. Bases de données..... 153
V.1.2. Programmes web..... 153
V.2. Oligonucléotides utilisés..... 153
V.3. Vecteurs utilisés..... 156
V.4. Souches bactériennes utilisées..... 157
V.5. Antibiotiques utilisés..... 158
V.6. Milieux de cultures utilisés..... 158
V.6.1. Milieux de culture utilisés pour la croissance des souches d'*E. coli* 159
V.6.2. Milieux de culture utilisés pour la croissance des souches de *Streptomyces*..... 159
V.7. Conditions de cultures..... 160
V.7.1. Croissance et stockage d'*E. coli*..... 160
V.7.2. Croissance et stockage de *Streptomyces*..... 160
V.8.Préparation des cellules compétentes..... 160
V.8.1 Préparation de protoplastes de souches de *Streptomyces*..... 160
V.8.2. Préparation de cellules compétentes d'*E. coli.*..... 161
V.8.2.1. Heat shock compétentes..... 161
V.8.2.2. Electro-compétentes..... 161
V.9. Solutions stocks de sucres..... 161
V.10. Techniques relatives à l'ADN..... 162
V.10.1. Amplification de l'ADN par PCR..... 162
V.10.2. Électrophorèse en gel d'agarose 162
V.10.3. Dosage d'une solution d'ADN..... 163

V.10.4. Conditions de ligation..... 163
V.10.4.1. Ligation dans le plasmide préparatif pJET2.1/blunt..... 163
V.10.4.2. Ligation dans un plasmide d'expression (pSET151, pET22b)..... 163
V.10.5. Digestion par des endonucléases de restriction..... 164
V.10.6. Extraction d'ADN..... 164
V.10.6.1. Extraction et purification d'ADN génomique de *Streptomyces*..... 164
V.10.6.2. Extraction et purification d'un plasmide chez *E. coli*..... 164
V.10.6.3. Extraction et purification d'un cosmide chez *E. coli*..... 164
V.10.7. Transformations..... 164
V.10.7.1. Transformation des souches d'*E. coli* par choc thermique..... 164
V.10.7.2. Transformation de la souche d'*E. coli* ET12567 par électroporation du cosmide SC7E4.2.F03..... 164
V.10.7.3. Transformation de protoplastes de *Streptomyces*..... 165
V.10.7.4. Transformation de spores de *Streptomyces* par conjugaison avec la souche d'*E. coli* ET12567..... 165
V.11. Techniques relatives à l'ARN..... 168
V.11.1. Extraction des ARNs totaux de cultures de *Streptomyces*..... 168
V.11.2. Traitement des ARNs à la DNAse..... 168
V.11.3. Quantification et analyse de la qualité des ARNs extraits..... 169
V.11.4. Analyse des ARNs messagers par RT-PCR semi-quantitative..... 169
V.12. Techniques relatives aux protéines..... 170
V.12.1. Préparation et dosage des protéines totales cytoplasmiques..... 170
V.12.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE)..... 170
V.12.3. Dot blot..... 171
V.12.4. Détection des activités hydrolytiques sur milieux gélosés..... 172
V.12.5. Production et purification de DasR..... 172
V.13. Retards de migration électrophorétique..... 174
V.14. Microscopie..... 175
V.15. PREDetector..... 175
VI. Bibliographie