

# Mécanismes moléculaires associés à l'induction de la pathogénicité chez *Streptomyces scabies*

Thèse défendue par **Samuel Jourdan** le 26 septembre 2016

En vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences

Promoteur : Docteur **Sébastien Rigali**

## Jury de thèse :

Professeur **Jaques Dommes** (Président)  
Université de Liège, Belgique

Professeur **Pierre Cardol** (Secrétaire)  
Université de Liège, Belgique

Professeur **Anne Legrève**  
Université Catholique de Louvain, Belgique

Docteur **Marc Ongena**  
Gembloux Agro-Bio Tech (ULg), Belgique

Docteur **Philippe Delfosse**  
Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann (LIST), Luxembourg

Docteur **Sébastien Rigali** (Promoteur)  
Université de Liège, Belgique

Les recherches présentées dans cette thèse ont été financées durant quatre années par le FRS-FNRS par l'intermédiaire d'une bourse d'aspirant FNRS.



*Je dédie ce travail à mon père, José Jourdan, pour qui j'ai la plus grande estime. Puisque dans nos Ardennes natales éprouver un sentiment s'apparente à une marque de faiblesse, je serai faible en te disant que je suis fier de t'avoir comme papa.*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le FNRS de m'avoir accordé une bourse d'aspirant de 4 ans m'ayant permis de réaliser ce travail. Je remercie également le professeur **Moreno Galleni**, directeur du centre d'ingénierie des protéines (CIP), de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du centre. Je remercie également l'ensemble des membres de mon comité de thèse de m'avoir suivi ces quatre années, mais également les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Séba** qui m'aura finalement suivi durant toutes les étapes de mon parcours scolaire. En effet, après avoir supervisé mon mémoire de graduat en 2009 puis mon mémoire de master en 2012, tu auras finalement supervisé le plus imposant et le plus important travail de mon parcours académique, cette thèse. Bien plus qu'un « boss », tu es un véritable leader pour le groupe « Strepto ». Tes qualités scientifiques et humaines engendrent une dynamique et une ambiance de travail qui font de la « Strepto team » un groupe idéal pour réaliser une thèse. La liberté de recherche que tu m'as accordée toutes ces années est une chance et un luxe dont je serai très certainement nostalgique d'ici peu. Enfin, je te remercie de la confiance que tu m'as accordée toutes ces années. J'espère de mon côté avoir été à la hauteur de tes attentes. Plus qu'un promoteur, tu es devenu un ami avec lequel j'apprécierai toujours avoir de longues discussions autour d'un verre, et sur lequel je pourrai toujours compter en cas de chute dans les bois de Tilff ;-).

Je remercie également l'ensemble des membres passés : **Matthias, Antho, Steph** et présents **Marta, Loic, Aymeric, Elo, Delphine, Benoit et Sinaeda** de la « Strepto team » que j'ai eu la chance de côtoyer. At the time of writing these lines, I have a special thought for my favourite Polish girl, **Marta**, who is currently managing the preparation of her wedding, writing her last papers and her thesis. Marta you are the embodiment of kindness, it was a real pleasure to work with you the last four years and I really hope that we will stay in touch ;-). I wish you all the best and to be happy with Chris, you deserve it more than anyone. **Loic**, tu m'emmerdes, je vais devoir te remercier à chaque point, d'abord ami et collègue de Master, puis coloc, partenaire de squash et enfin de nouveau collègue de doctorat...dois-je commencer à longer les murs?

Je tiens aussi à remercier mes deux compères **Max** et **Antho** avec lesquels nous avons bravé tous les temps et toutes les saisons sur notre petit balcon du 1<sup>er</sup> (Max il serait d'ailleurs temps que tu viennes le nettoyer ;-)). Je vous attends pour le prochain « European Poker Tour 2016 » et les suivants ☺. Antho, promis on passera 99 luftballons pour ne pas te dépayser ! Max, je regretterai nos soupers de Noël du CIP où nos déguisements de renne, lutin, lapin ou autres, ont fait de nous les vedettes d'un soir!

Je remercie également l'ensemble des membres du CIP (que je ne citerai pas au risque d'en oublier par inadvertance) qui font de cet établissement un environnement de travail des plus



agréables. Je pense particulièrement à **Caro**, toujours fidèle à la pause café et au repas de midi et qui veille sur nous comme sur ses propres enfants. Ce fut un réel plaisir de te côtoyer au quotidien! Merci aussi à tous les autres doctorants et étudiants que j'ai pu rencontrer ou avec lesquels j'ai eu la chance de travailler, notamment **Madeleine**, à qui les frappes sur l'épaule et les remarques désagréables vont bientôt manquer ☺. Ton rire plus que facile va certainement me manquer aussi!

Je tiens aussi à remercier **Fred** qui m'a enseigné les rudiments et la frustration de la cristallographie, qui m'a permis de vivre les nuits blanches au synchrotron, et qui a également passé de nombreuses heures à tenter de résoudre la structure de CebE. Je remercie également **JMF** (ou Dieu) pour m'avoir sorti des galères rencontrées lors de la détermination des constantes de liaison et d'enzymologie. La facilité avec laquelle vous pouvez transformer un problème biologique en équation mathématique est presque écoeuvrante. Je suis très heureux et fier d'avoir pu côtoyer l'entité scientifique que vous êtes.

Un tout grand merci à **Emi** et **Nic** d'avoir accepté de relire ce manuscrit dans la précipitation des derniers jours précédant l'impression de cette thèse.

Je remercie mes parents, **Papa** et **Maman** ☺ qui m'ont toujours laissé l'opportunité d'effectuer mes propres choix de vie et d'études. Si je suis ce que je suis aujourd'hui (pour le meilleur et pour le pire !?) c'est aussi grâce à vous. Je remercie également mes frères **Nicolas** et **Benjamin**, mes belles-sœurs **Kathleen** et **Amandine**, mais aussi mes neveux **Mathéo** et **Diégo** pour tous les excellents moments passés en votre compagnie et qui rendent mes retours dans nos Ardennes (malheureusement moins fréquents que je ne le voudrais) encore plus agréables. J'aurai enfin une pensée émue pour mon papy **Camille**, ma mamy **Gilberte** et enfin ma bonne maman **Anne-Marie** qui nous ont quitté durant mon doctorat.

Je remercie également tous mes amis : **François** et **Catharina**, **Guillaume** et **Céline**, **Thomas** et **Catherine**, **Loic** et **Émilie** et enfin **Aurélie** et **Manu** qui m'ont fait l'honneur de devenir le parrain de leur petite **Suzy**. Vous êtes mes amis, vous savez ce que vous représentez pour moi, je n'ai donc pas besoin de vous faire de longs éloges ;-). Je suis fier de vous avoir.

Je remercie tous les colocataires avec lesquels j'ai eu la chance de partager le même toit: **Yolaine**, **Thibaud**, **Loic** (encore toi !), **Lucas**, **Céline**, **Pierre**, **Pierre-Alain**, **Rachel** et **Stéphane**.

Je remercie aussi **Trey Parker** et **Matt Stone** pour avoir créé la meilleure série de tous les temps ainsi que les membres du groupe **In Flames** pour les orgasmes auditifs qu'ils m'ont procuré.

Enfin, la plus belle trouvaille que j'ai pu faire durant cette thèse s'écrit certes avec quatre lettres, mais ne se trouvait pas au fond d'un gel d'agarose, d'une cuvette en quartz ou encore à la sortie d'une colonne de purification, mais bien dans un couloir du CIP. **Nora**, tu es sans nul doute ma plus belle découverte. Je te remercie pour tous les bons moments passés à tes côtés, pour ta sollicitude (mise à rude épreuve en août 2015 ;)), mais également pour ton soutien et ta patience ces dernières semaines.

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES ACIDES AMINÉS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLES .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>12</b>
1.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU GENRE <i>STREPTOMYCES</i> .....	12
1.1.1 <i>Génétique</i> .....	12
1.1.2 <i>Rôle des Streptomyces dans la nature</i> .....	12
1.1.3 <i>Métabolisme secondaire</i> .....	14
1.2 CYCLE DE VIE ET DÉVELOPPEMENT .....	18
<i>La phase de transition</i> .....	18
1.2.1 <i>Les gènes impliqués dans le développement des Streptomyces</i> .....	20
1.3 MÉTABOLISME DU CARBONE .....	24
1.3.1 <i>Les polymères d'origine végétale</i> .....	24
1.3.2 <i>Les enzymes catalysant la dégradation des polysaccharides</i> .....	28
1.3.3 <i>Les systèmes de transport des sucres chez les Streptomyces</i> .....	32
1.3.4 <i>Régulation génétique des systèmes d'utilisation des sucres chez les Streptomyces</i> .....	37
1.4 IMPLICATION DES SUCRES DANS LA DIFFÉRENCIATION PHYSIOLOGIQUE ET MORPHOLOGIQUE CHEZ LES <i>STREPTOMYCES</i> ..	40
1.4.1 <i>Répression catabolique par le glucose</i> .....	40
1.4.2 <i>Implication des protéines générales du PTS dans le développement des Streptomyces</i> .....	41
1.4.3 <i>N-acétylglucosamine et développement</i> .....	42
1.4.4 <i>Implication du régulateur CebR dans le développement chez S. griseus</i> .....	43
1.5 LA PHYTOPATHOGENICITÉ CHEZ LES <i>STREPTOMYCES</i> .....	45
<b>2 STREPTOMYCES SCABIES .....</b>	<b>47</b>
2.1 HISTORIQUE : UN MICROORGANISME À L'ORIGINE DE LA GALE COMMUNE DE LA POMME DE TERRE.....	47
2.2 TAXONOMIE .....	47
2.3 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> .....	48
2.3.1 <i>Caractéristiques génétiques</i> .....	48
2.3.2 <i>La gale commune</i> .....	50
2.4 LES AUTRES <i>STREPTOMYCES</i> PHYTOPATHOGENES.....	51
2.5 LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA COLONISATION DE L'HÔTE PAR <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> .....	56

2.6	LES FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> .....	58
2.6.1	<i>Les thaxtomines</i> .....	58
2.6.2	<i>Nec1</i> .....	74
2.6.3	<i>La tomatinase TomA</i> .....	77
2.6.4	<i>Autres facteurs de virulence associés aux streptomycètes phytopathogènes</i> .....	80
2.7	L'ÎLOT DE PATHOGÉNICITÉ .....	86
<b>3</b>	<b>ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS</b> .....	<b>92</b>
<b>4</b>	<b>RESULTS</b> .....	<b>93</b>
4.1	SEARCH FOR NOVEL TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN THAXTOMIN BIOSYNTHETIC GENES EXPRESSION CONTROL ...	93
4.1.1	<i>Identification of CebR-binding sites associated with thaxtomin biosynthetic genes</i> .....	95
4.1.2	<i>Deletion of cebR results in constitutive production of thaxtomin A.</i> .....	97
4.1.3	<i>Deletion of cebR leads to hypervirulence in S. scabies.</i> .....	99
4.1.4	<i>New pieces of the puzzle for thaxtomin regulation.</i> .....	99
4.2	THE CEBE/MSIK TRANSPORTER IS A DOORWAY TO THE CELLO-OLIGOSACCHARIDE-MEDIATED INDUCTION OF <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> PATHOGENICITY .....	101
4.2.1	<i>In silico identification of the predicted cello-oligosaccharide transporter in S. scabies</i> .....	103
4.2.2	<i>Cellobiose and cellotriose interact with CebE of S. scabies at a nanomolar range</i> .....	103
4.2.3	<i>Effect of the inactivation of cebE and msik on thaxtomin production and virulence</i> .....	105
4.2.4	<i>The cebEFG operon is repressed by CebR and induced by cellobiose</i> .....	107
4.2.5	<i>Discussion</i> .....	109
4.3	ROLE OF THE BETA-GLUCOSIDASE BglC IN THE FATE OF THE THAXTOMIN INDUCING CELLO-OLIGOSACCHARIDES IN <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> .....	111
4.3.1	<i>BglC cleaves specifically cello-oligosaccharides into glucose</i> .....	113
4.3.2	<i>The predicted beta-glucosidase BglC is controlled by CebR</i> .....	113
4.3.3	<i>Induction of intracellular Beta-glucosidase activity of S. scabies correlates with extracellular cellobiose and cellotriose consumption</i> .....	115
4.3.4	<i>Phenotype of the bglC mutant</i> .....	117
4.3.5	<i>Discussion</i> .....	117
<b>5</b>	<b>INDUSTRIAL APPLICATIONS</b> .....	<b>119</b>
5.1	METHODS FOR THAXTOMIN PRODUCTION AND MODIFIED <i>STREPTOMYCES</i> WITH INCREASED THAXTOMIN PRODUCTION	119
5.1.1	<i>Why to increase thaxtomin production?</i> .....	119
5.1.2	<i>Deletion of cebR results in constitutive production of thaxtomin</i> .....	121
5.1.3	<i>Thaxtomin production with the ΔcebR mutant at larger scale</i> .....	121
5.1.4	<i>Thaxtomin production at larger scale</i> .....	123
5.1.5	<i>Conclusion</i> .....	124
5.2	USE OF A SUGAR TOLERANT B-GLUCOSIDASES .....	125

5.2.1	Introduction.....	125
5.2.2	$\beta$ -glucosidase: a key component of cellulose hydrolysis .....	127
5.2.3	Caracterization of the $\beta$ -glucosidase BglC from <i>Streptomyces scabies</i> .....	129
5.2.4	Determination of the glucose effect on BGs activity using pNP $\beta$ G as substrate; most-likely a wrong procedure. ....	139
5.2.5	Perspectives.....	145
<b>6</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>148</b>
6.1	LA LEVÉE DE LA RÉPRESSION PAR CEBR .....	148
6.1.1	Cellooligosaccharides provenant d'un tissu végétal vivant.....	149
6.1.2	Cellooligosaccharides provenant d'un tissu végétal mort.....	151
6.2	L'EXPRESSION DE BLDA .....	151
6.3	MODÈLES PROPOSÉS .....	153
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>155</b>
7.1	ANALYSE DU RÉGULON CEBR CHEZ <i>S. SCABIES</i> .....	155
7.1.1	Le paradoxe de <i>S. scabies</i> .....	155
7.1.2	Le système à deux composants : AfsQ1/AfsQ2 .....	159
7.1.3	Le régulateur pléiotrope AdpA/BldH .....	161
7.2	PRÉDICTION DU RÉGULON CEBR CHEZ D'AUTRES <i>STREPTOMYCES</i> .....	163
7.2.1	Prédiction du régulon CebR chez <i>Streptomyces avermilitis</i> .....	163
7.3	AUTRES RÉGULATEURS POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS DANS LA PATHOGÉNICITÉ CHEZ <i>STREPTOMYCES SCABIES</i> .....	167
7.3.1	Le régulateur GlnR.....	167
<b>8</b>	<b>MATÉRIEL ET METHODS .....</b>	<b>169</b>
8.1	BACTERIAL STRAINS, MEDIA, CHEMICALS, AND CULTURE CONDITIONS .....	169
8.2	MOLECULAR BIOLOGY EXPERIMENTS.....	170
8.2.1	Gene amplification by PCR .....	170
8.2.2	pJET1.2/blunt cloning.....	171
8.2.3	Restriction endonuclease digestion and ligation.....	171
8.2.4	<i>E. coli</i> competent cell preparation and transformation .....	171
8.3	PROTEINS PRODUCTION AND PURIFICATION.....	173
8.4	PROTEIN-LIGAND INTERACTION ASSAYS .....	173
8.4.1	Tryptophan Intrinsic fluorescence assays.....	173
8.4.2	EMSAs.....	174
8.4.3	$\beta$ -glucosidase assays .....	175
8.5	TARGETED PROTEOMIC ANALYSIS .....	177
8.6	GENERATION OF THE <i>CEBR</i> , <i>CEBE</i> , <i>MSIK</i> AND <i>BGLC</i> GENES DELETIONS IN <i>S. SCABIES</i> 87-22 .....	179
8.7	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR .....	180

8.8	THAXTOMIN EXTRACTION AND QUANTIFICATION .....	180
8.9	VIRULENCE BIOASSAYS .....	181
8.9.1	<i>With <math>\Delta cebR</math> mutant</i> .....	181
8.9.2	<i>With <math>\Delta cebE</math> and <math>\Delta msrK</math> mutants</i> .....	181
8.10	FERMENTATION ASSAYS .....	181
8.11	BIOINFORMATICS .....	183
8.11.1	<i>Phylogeny and synteny</i> .....	183
8.11.2	<i>Modeling</i> .....	183
8.11.3	<i>Regulon prediction in streptomycetes</i> .....	183
8.12	TABLES .....	184
9	ANNEXES .....	188
10	RÉFÉRENCES .....	193

# Résumé

Les *Streptomyces* sont des microorganismes filamenteux vivant dans le sol où ils participent activement à la minéralisation de la matière organique morte. Les membres de ce genre bactérien sont principalement connus pour le nombre pléthorique et la grande variété de métabolites secondaires d'intérêts qu'ils sécrètent. Majoritairement saprophytes, quelques espèces de *Streptomyces* se sont néanmoins révélées être pathogènes pour les végétaux. La plus répandue et la plus caractérisée de ces espèces est *Streptomyces scabies* qui est responsable de la gale commune qui touche les organes souterrains de nombreux végétaux avec une préférence pour les organes de réserve tels que les tubercules de pommes de terre ou les racines pivots (betteraves, navets, carottes, etc.). Cette affection se caractérise par des lésions brunâtres et disgracieuses au niveau des organes infectés et engendre des pertes économiques importantes dans plusieurs régions du monde.

Le caractère pathogène de *S. scabies* est directement lié à sa capacité à produire la thaxtamine. Comprendre quand, comment et pourquoi *S. scabies* déclenche la production de cette phytotoxine est donc d'un intérêt majeur dans l'étude de la pathogénicité et la virulence associée à cette bactérie. Les travaux antérieurs visant à répondre à ces questions ont notamment identifié le cellobiose comme étant la molécule élicitrice principalement responsable de l'induction de la production de thaxtamine. Cependant, aucune voie de signalisation complète depuis la perception du signal éliciteur jusqu'à la synthèse de thaxtamine n'a encore été proposée. L'objectif de ce travail était d'élucider les mécanismes moléculaires associés au déclenchement de la production de thaxtamine chez l'espèce modèle *S. scabies*.

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence le rôle central du répresseur transcriptionnel CebR dans le déclenchement de la pathogénicité chez *S. scabies*. En effet, nous avons montré que ce régulateur contrôle directement l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine, mais également l'expression des gènes responsables de la perception, du transport et du catabolisme des éliciteurs induisant la synthèse de la phytotoxine. Ensemble, ces résultats nous ont permis de proposer un premier modèle de la voie de signalisation depuis le transport de celooligosaccharides jusqu'au déclenchement du comportement pathogène de *S. scabies*.

Au-delà de l'aspect fondamental, nous avons également cherché à exploiter certains des résultats obtenus afin de proposer des solutions à certains obstacles rencontrés dans différents secteurs de biotechnologie industrielle à savoir, i) proposer un mutant constitutif de production de thaxtamine afin d'augmenter les rendements de production ce bioherbicide prometteur, et ii) évaluer les propriétés enzymatiques d'une Beta-glucosidase de *S. scabies* en vue d'une exploitation dans les processus de saccharification de la lignocellulose.

## Summary

*Streptomyces* are filamentous soil-dwelling bacteria that actively participate in the mineralization of dead organic matter. Members of this bacterial genus are commonly known for the plethora of secondary metabolites of interest they secrete. Predominantly saprophytes, some *Streptomyces* species have been proved to be phytopathogenic. The most widespread and best characterized of these species is *Streptomyces scabies* which is the causative agent of the common scab disease that affects the underground organs of many plants with a preference for storage organs such as potato tubers or pivot roots (beet, turnip, carrot, etc.). Common scab is characterized by brown and corky lesions on the infected organs and causes significant economic losses around the world.

The pathogenicity of *S. scabies* is directly related to its ability to produce the phytotoxin thaxtomin. Unveiling when, how and why *S. scabies* triggers the production of its phytotoxin is therefore of major interest to understand phytopathogenicity and the virulence associated with this bacteria. Previous works identified cellobiose as the main elicitor of thaxtomin production. However, no signaling pathway from the sensing of the eliciting signal to the biosynthesis of thaxtomin has been proposed so far. The aim of this work is to elucidate the molecular mechanisms involved in the onset of thaxtomin production in the model species *S. scabies*.

In this work we highlighted the central role of the cellulose utilization transcriptional repressor CebR in *S. scabies* pathogenicity. Indeed, we showed that this regulator directly controls the expression of thaxtomin biosynthesis genes, but also the expression of genes involved in sensing, transport and catabolism of cellooligosaccharides. Together, our results allow to propose a first signaling pathway from cellooligosaccharide transport to the production of thaxtomin in *S. scabies*, with each step of the cascade controlled by CebR.

The results obtained in the course of this thesis extended well beyond the fundamental research scope of elucidating the mechanisms associated with the onset of virulence of *S. scabies*. Indeed, assessed if/how our findings could propose solutions to current industrial biotechnology applications, i.e. i) to provide a mutant that constitutively produce thaxtomine could improve the production yields of this promising bioherbicide, and ii) to assess the enzymatic characteristics of a Beta-glucosidase of *S. scabies* as possible candidate in lignocellulose saccharification processes.

## Liste des abréviations

(Glc)<sub>2</sub>: cellobiose  
(Glc)<sub>3</sub>: cellotriose  
°C : degré celcius  
μm : micromètre  
μM : micromolaire  
μmol: micromole  
2D: deux dimentionions  
3D: trois dimentionions  
A : Adénosine  
AA : Activité Auxiliaire  
ABC : ATP Binding Cassette  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine diphosphate  
AFTR: AraC family transcriptional regulator  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNt : ARN de transfert  
ATCC : American Type Culture Collection  
ATP : Adénosine triphosphate  
AUC : Area Under the Curve  
BG: β-glucosidase  
BLAST: Basic local alignment search tool  
*bld* : bald (mutant)  
BSA : bovine serum albumin  
C : Cytidine  
CAZy : Carbohydrate Active Enzymes  
CBM : Carbohydrate Binding Module  
CBS : catalytic binding site  
*cbs* : CebR binding site  
CE : Carbohydrate Esterase  
CESA : Cellulose synthases A  
CFA : Acide coronafacique  
CFA-Ile : Coronafacoyl-L-isoleucine  
CHES : N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid  
CMA : Acide coronamique  
Cy5: Cyanine 5  
Da : Dalton  
dcw : dry cell weight  
EC : Enzyme Commission number  
ECF-SF : Extracytoplasmique fonction SF  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
EMSA: Electromobility gel shift assays



EP : European patent  
 ESI: Electrospray ionization  
 FAO : Food and Agriculture Organisation of united nation  
 FRT : Flippase Recognition tTarget  
 g : gramme  
 G : Guanosine  
 GFP : Green Fluorescent Protein  
 GH : Glycosylhydrolase  
 GlcNAc : N-acétylglucosamine  
 GT : Gycosyltransferase  
 GTP : Guanosine triphosphate  
 h : heure  
 HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
 HG : Homogalacturonane  
 HGT : Horizontal gene transfert  
 hpi : hour post inoculation  
 HPLC : High-performance liquid chromatography  
 HTH : Helix-Turn-Helix  
 IAA : acide 3-indole-acétique  
 IARC: International Agency for Research on Cancer  
 ICE : Integrative and Conjugative Element  
 ICNP : International Code of Nomenclature of Prokaryotes  
 Inc. : incorporated  
 IPTG: isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside  
 IS : Insertion sequence  
 ISP : Internationnal *Streptomyces* Project  
 kb : kilobase  
 $K_D$ : dissociation constants  
 kDA : kilodalton  
 $K_i$  : constante d'inhibition  
 $K_m$  : constante d'Henri-Michelis-Menten  
 kV : kilovolt  
 L : litre  
 LB : Luria-Bertani  
 LC-MRM: liquid chromatography-multiple reaction monitoring  
 LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry  
 LPMO : Lytic Polysaccharide MOnooxygénase  
 M : molaire (mole/litre)  
 m/m : masse/masse  
 m/v : masse volume  
 m/z : masse/charge  
 Mb : Mégabase  
 MCP : Mort Cellulaire Programmé  
 MES : 2-(N-morpholino)-éthanesulfonic acid  
 mg : milligramme

min : minute  
 mL : millilitre  
 mM : millimolaire  
 MM: Minimal Media  
 MSF : Major Facilitator Superfamily  
 MW : molecular weight  
 NBD : Nucleotide binding domaine  
 NCBS : non-catalytic binding site  
 NC-IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology  
 ng : nanogramme  
 NJ : Neighbor Joining  
 nm : nanomètre  
 nM : nanomolaire  
 NRP : Non-ribosomal peptide  
 NRPS : Non-ribosomal peptide synthase  
 nt: nucleotide  
 NTA : nitrilotriacetic acid  
 OBA : Oat Bran Agar media  
 OCS : One Component System  
 OD: Optical Density  
 ORF : Open Reading Frame  
 PAI : Pathogenicity Island  
 pb : paire de base  
 PCR : Polymerase Chain Reaction  
 PDB : Protein Data Bank  
 PEP : Phosphoénolpyruvate  
 pH : potentiel Hydrogène  
 PK : polyketide  
 PKS : Polyketide Synthase  
 PL : Polysaccharide Lyase  
 p-NPβG: 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside  
 PTS : phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system  
 PVDF : Polyvinylidene difluoride  
 qPCR : Quantitative real-time reverse transcription-PCR  
 rpm : rotation par minute  
 s : seconde  
 SCM : subérine-cellobiose media  
 SF : Sigma Factor  
 SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation  
 T : Thymidine  
 T° : température  
 TCA: Trichloroacetic acid  
 TCS : Two Component System  
 TDM : Thaxtomine-Defined Media  
 TDMc: Thaxtomine-Defined Media + cellobiose

TDMx: Thaxtomine-Defined Media + cellobiose + xylose

TDMx: Thaxtomine-Defined Media + xylose

TLC: Thin Layer Chromatography

TMD : transmembrane domaine

TOF : Time Of Flight

TR : Toxicogenic Region

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

TSB : Tryptic Soy Broth

U : Uridine

UPLC: Ultra High-Performance Liquid Chromatography

v/v : volume/volume

V: Volt

Vi : Vitesse initiale

*whi* : white (mutant)

WO : World Intellectual Property Organization

WT : Wild Type

$\lambda$ : longueur d'onde

## Liste des acides aminés

Acide aminé	Code à trois lettres	Code à une lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartate	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

## Liste des figures

Figure 1: Morphologie des bactéries du genre <i>Streptomyces</i> .....	13
Figure 2: Représentation schématique d'un NRPS à quatre modules .....	15
Figure 3: Cycle de vie des <i>Streptomyces</i> .....	17
Figure 4: Courbe de croissance de <i>Streptomyces</i> en milieu solide .....	19
Figure 5 : Phénotypes de la souche sauvage, d'un mutant <i>bld</i> et d'un mutant <i>whi</i> de <i>S. coelicolor</i> sur milieu riche. ....	21
Figure 6: Schéma de la boucle de rétroaction entre <i>bldA</i> et AdpA.....	21
Figure 7: Structure chimique d'une chaîne de cellulose .....	23
Figure 8: Structure chimique de la cellulose cristalline.....	23
Figure 9: Organisation d'une fibre de cellulose .....	23
Figure 10 : Illustration de différents types d'hémicelluloses .....	25
Figure 11: Représentation de la structure des pectines .....	27
Figure 12: Schématisation de l'hydrolyse de la cellulose par les différentes cellulases .....	31
Figure 13: Mécanisme de transport d'un substrat par un ABC transporteur de type importeur.....	33
Figure 14: Différents systèmes de transport de sucres identifiés chez les <i>Streptomyces</i> .....	33
Figure 15: Représentation schématique du système de phosphotransférase des sucres.....	35
Figure 16 : Représentation schématique des transporteurs de la superfamille MSF .....	35
Figure 17 : Représentation schématique des systèmes à un ou deux composants.....	39
Figure 18: Phénotype des mutants du PTS chez <i>S. coelicolor</i> .....	42
Figure 19: Cascade signalétique complète depuis la perception de la GlcNAc jusqu'à la production d'antibiotique chez <i>S. coelicolor</i> .....	44
Figure 20 : Phénotype du mutant $\Delta cebR$ de <i>S. griseus</i> .....	45
Figure 21 : Roland Thaxter (1858-1932).....	49
Figure 22: Symptômes associés à l'infection par <i>Streptomyces scabies</i> . ....	49
Figure 23: Effets de l'infection d'un plant de tabac par <i>S. scabies</i> . ....	52
Figure 24: Symptômes associés aux infections causées par différents <i>Streptomyces</i> phytopathogènes. ....	52
Figure 25: Illustrations des premières étapes de la colonisation d'un tubercule de pomme de terre par <i>S. scabies</i> . ....	55
Figure 26: Les <i>Streptomyces</i> phytopathogènes évoluent intra et intercellulairement.....	55
Figure 27 : Liste des différents membres de la famille des thaxtomines.....	57
Figure 28: Biosynthèse de la thaxtomine A.....	59
Figure 29: Production de thaxtomine A des différents mutants <i>bld</i> de <i>S. scabies</i> 87-22 .....	63

Figure 30: Structure chimique du cellobiose ou $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose .....	63
Figure 31: Effet de la concentration en cellobiose sur la production de thaxtamine par <i>S. turgidiscabies</i> Car8 .....	65
Figure 32: Illustration de la structure chimique de la subérine .....	65
Figure 33: Le tryptophane induit un switch entre la synthèse de thaxtamine et d'auxine chez <i>S. scabies</i> . .....	69
Figure 34 : Structures chimiques de l' $\alpha$ -solanine et de l' $\alpha$ -chaconine. ....	69
Figure 35: La thaxtamine A induit une hypertrophie cellulaire .....	71
Figure 36: La thaxtamine A induit une nécrose sur des tranches de tubercule de pomme de terre ...	71
Figure 37: Modèle représentant l'effet de la thaxtamine sur les mouvements d'ions au travers des membranes végétales .....	73
Figure 38 : Le gène <i>nec1</i> est nécessaire à la colonisation des extrémités racinaires.....	75
Figure 39: Le gène <i>nec1</i> participe à la virulence de <i>S. turgidiscabies</i> .....	75
Figure 40: Structure chimique de l' $\alpha$ -tomatine.....	77
Figure 41 : Structure chimique de la pyocheline (Quadri et al. 1999) .....	79
Figure 42: Structure chimique des desferrioxamines B et E (Tierrafría et al. 2011) .....	79
Figure 43: Structure chimique de la scabicheline (Kodani et al. 2013) .....	79
Figure 44: Structure chimique de la coronafacoyl-L-isoleucine (CFA-Ile) .....	82
Figure 45 : Structure chimique des concanamycines A et B .....	84
Figure 46 : Structure chimique du FD-891 .....	85
Figure 47 : Structure chimique de la borrelidine .....	86
Figure 48 : Organisation génétique de l'îlot de pathogénicité chez <i>S. turgidiscabies</i> Car8, <i>S. acidiscabies</i> 84-104 et <i>S. scabies</i> 87-22.....	88
Figure 49: Modèle d'évolution de l'îlot de pathogénicité chez les <i>Streptomyces</i> phytopathogènes ...	91
Figure 50: Multiple alignment of <i>S. griseus</i> CebR-binding sites ( <i>cbs</i> ) .....	94
Figure 51: CebR binding to <i>cbs</i> associated with thaxtomin biosynthetic genes is relieved by cellobiose. .....	94
Figure 52: Effect of <i>cebR</i> deletion in <i>S. scabies</i> on the transcription levels of the thaxtomin biosynthetic and regulatory genes.....	96
Figure 53: Effect of the <i>cebR</i> deletion on thaxtomin production in <i>S. scabies</i> . ....	96
Figure 54: Effect of the deletion of <i>cebR</i> on the virulence of <i>S. scabies</i> . ....	98
Figure 55 : Genetic complementation of the <i>cebR</i> mutant scored by thaxtomin production.....	98
Figure 56: Synteny of the <i>cebR-cebEFG-bgIC</i> cluster and <i>msiK</i> locus in several <i>Streptomyces</i> species. .....	100

Figure 57: Organization of the putative cellobiose ABC transporter gene cluster and phylogeny analysis of CebE orthologues. ....	102
Figure 58: Predicted three-dimensional structure of CebE of <i>S. scabies</i> . ....	102
Figure 59: Fluorescence emission spectra of the pure 6His-CebE protein alone and added with celooligosaccharides or other disaccharides.....	104
Figure 60: CebE of <i>S. scabies</i> interacts with cellobiose and cellotriose in the nanomolar range. ....	104
Figure 61: Effect of <i>cebE</i> and <i>msiK</i> deletion in <i>S. scabies</i> 87-22 on the production of thaxtomin. ....	106
Figure 62: Effect of <i>cebE</i> and <i>msiK</i> deletion on the virulence of <i>S. scabies</i> . ....	106
Figure 63: Effect of <i>cebE</i> deletion on <i>S. scabies</i> growth in liquid TDM supplied with cellobiose as sole carbon source.....	108
Figure 64: CebR directly represses transcription of genes encoding components of the cellobiose/cellotriose-specific ABC transporter. ....	108
Figure 65: Relative abundancy of CebE (A) and MsiK (B) peptides in response to the deletion of <i>cebR</i> and/or cellobiose supply, determined by targeted proteomics (LC-MRM). ....	110
Figure 66: Model of the cellobiose /cellotriose-mediated induction of thaxtomin production in <i>S. scabies</i> . ....	110
Figure 67: TLC analysis of cellobiose and cello-oligosaccharides hydrolysis by purified BglC .....	112
Figure 68: Curve of initial velocity of BglC ( $V_i$ ) at different cellobiose concentrations.....	112
Figure 69: Relative abundancy of BglC peptides in response to the deletion of <i>cebR</i> and/or cellobiose supply, determined by targeted proteomics (LC-MRM). ....	114
Figure 70: Dynamics of cellobiose or cellotriose concentrations in the culture supernatants of <i>Streptomyces scabies</i> 87-22 .....	114
Figure 71: Thaxtomine A production by the $\Delta bglC$ mutant of <i>S. scabies</i> on ISP4.....	116
Figure 72: Thaxtomine A production by the $\Delta bglC$ mutant of <i>S. scabies</i> on TDM.....	116
Figure 73: Metabolic pathways from cellobiose and cellotriose transport to glycolysis and thaxtomin production. ....	118
Figure 74: Effect of the addition of cellobiose and/or the deletion of <i>cebR</i> on thaxtomin production by <i>S. scabies</i> 87-22. ....	120
Figure 75: Scheme of a bioreactor used in biofilm fermentation. ....	120
Figure 76: Thaxtomin production by the <i>S. scabies</i> $\Delta cebR$ mutant strain in Rushton turbine agitator. ....	122
Figure 77: Thaxtomin production in 4 L biofilm reactors (left) and biofilm colonization of the metallic support (right) after the fermentation process.....	122
Figure 78: Schematic representation of the $\beta$ -glucosidase-catalyzed turnover of a substrate. ....	126
Figure 79: Effect of temperature and pH on BglC activity.....	128

Figure 80: Effect of D-glucose, and D-xylose on BglC activity. ....	128
Figure 81: Effect of ethanol or NaCl on BglC activity. ....	130
Figure 82: Effect of addition of BglC on cellulose hydrolysis by DELTAGAS® AT-150 enzymes mixture. .....	132
Figure 83: Lateral view of the catalytic interface of HiBG.....	138
Figure 84: Schematic representation of BG reactions that could occur at different glucose and substrate concentrations. ....	138
Figure 85: Curve of the initial velocity of BglC (Vi) at different <i>p</i> -NPβG concentrations.....	138
Figure 86: <i>p</i> -NPβG concentration modifies the effect of D-glucose and D-xylose on BglC activity....	140
Figure 87: Time course of cellobiose hydrolysis by BglC.....	140
Figure 88 : Transglycosylation reactions that could occur with <i>p</i> -NPβG or cellobiose as substrate ..	142
Figure 89: Surimposition of the HiBG structure and the model of BglC. ....	144
Figure 90 : Multiple alignments of amino acids sequences of BglC orthologues from <i>Streptomyces</i> species .....	146
Figure 91 : Modeled BglC from <i>S. acidiscabies</i> .....	146
Figure 92 : Modèle de l'induction de la production de thaxtomine par <i>S. scabies</i> en fonction de son environnement.....	154
Figure 93: Vérification <i>in vitro</i> des interactions entre 6His-CebR et les <i>cbs</i> potentiels identifiés chez <i>S.</i> <i>scabies</i> . ....	156
Figure 94: Séquence consensus du <i>cbs</i> chez <i>S. scabies</i> et <i>S. griseus</i> . ....	156
Figure 95: Schéma des réseaux de régulations potentiels reliant CebR à l'utilisation de l'amidon. ..	158
Figure 96 : Activités amylolytiques du mutant $\Delta$ <i>cebR</i> et de la souche sauvage de <i>S. scabies</i> . ....	159
Figure 97: Alignement des séquences des régions contenant le site potentiel de liaison de CebR dans la séquence codante des orthologues de <i>adpA/bldH</i> de différents <i>Streptomyces</i> . ....	160
Figure 98: Phénotype du mutant $\Delta$ <i>cebR</i> et de la souche sauvage de <i>S. scabies</i> sur milieu ISP4. ....	160
Figure 99: Phénotype du mutant $\Delta$ <i>cebR</i> et de la souche sauvage de <i>S. scabies</i> sur milieu ISP7. ....	160
Figure 100: Modèle de la régulation par SmrAB-Sig25 de la production d'ivermectine et d'oligomycine chez <i>S. avermitilis</i> . ....	164
Figure 101: Position des éléments <i>cis</i> identifiés entre <i>smrA</i> et <i>sig25</i> chez <i>S. avermitilis</i> .....	164
Figure 102: Weblogo obtenu à partir des séquences reconnues par le régulateur GlnR chez <i>S. coelicolor</i> et <i>S. venezuelae</i> . ....	166
Figure 103: Validation de l'interaction entre GlnR et le <i>gbs</i> identifié en amont de <i>cebE</i> .....	166
Figure 104 : SDS-PAGE showing the level of purity of His <sub>6</sub> -tagged proteins used in this thesis. ....	172
Figure 105: CebR position weight matrix (PWM). ....	182

## Liste des tables

Table 1: Liste de quelques métabolites secondaires d'intérêt produits par différentes espèces de <i>Streptomyces</i> .....	13
Table 2 : Liste des espèces de <i>Streptomyces</i> phytopathogènes, maladies engendrées et localisation.....	54
Table 3 : Effect of various oses/reagents on BglC activity.....	130
Table 4: Parameters of (A) glucose tolerant and (B) glucose tolerant and stimulated BGs.....	136
Table 5: Strains and plasmids used in this thesis .....	184
Table 6: Oligonucleotides used in this thesis .....	185
Table 7 : Prédiction du régulon CebR chez <i>S. scabies</i> (région intergénique) .....	188
Table 8 : Prédiction du régulon CebR chez <i>S. scabies</i> (regions intragénique).....	190
Table 9 : Prédiction du régulon CebR chez <i>S. avermitilis</i> (région intergénique) .....	191
Table 10 : Prédiction du régulon CebR chez <i>S. avermitilis</i> (regions intragénique) .....	192



# 1 Introduction générale

## 1.1 Caractéristiques générales du genre *Streptomyces*

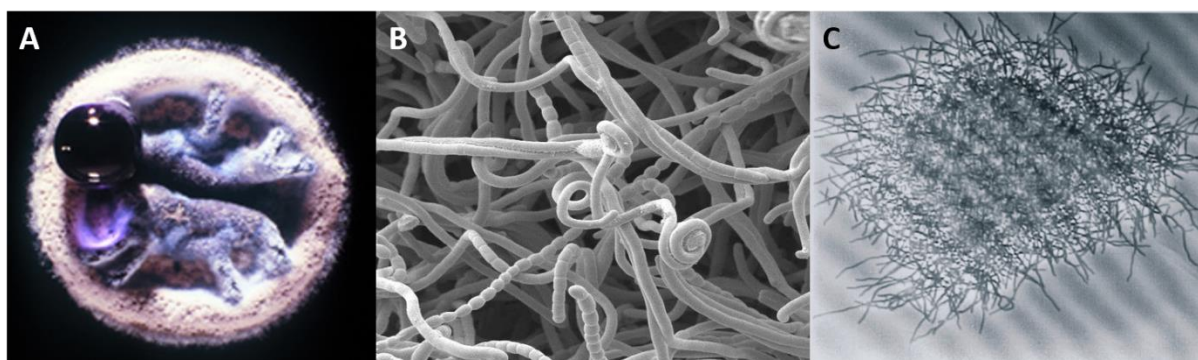
L'origine du nom *Streptomyces* vient du grec « *streptos* » signifiant courbé ou tordu, et « *myces* » signifiant champignon. L'étymologie peut prêter à confusion : les individus appartenant à ce genre ne sont pas des champignons mais bien des bactéries dont on compte plus de 900 espèces (Labeda et al. 2012). Les *Streptomyces* se sont révélés être d'un intérêt majeur tant dans le domaine de la recherche fondamentale que sur le plan industriel. En effet, de par leur cycle de vie complexe les *Streptomyces* constituent un modèle unique dans l'étude du développement chez les procaryotes, tout comme ils attirent l'attention des industriels de par les nombreux métabolites secondaires qu'ils produisent naturellement (Chater et al. 2010).

### 1.1.1 Génétique

Les *Streptomyces* sont des microorganismes aérobies, filamenteux et sporulants appartenant à l'ordre des actinomycétales (Figure 1). Comme l'ensemble des membres appartenant à cette unité taxonomique, les *Streptomyces* sont des bactéries Gram-positives possédant un génome riche en G-C (entre 69 et 78 %). Ce dernier se différencie de la plupart des génomes des autres bactéries de par la forme linéaire de son chromosome ainsi que par sa taille particulièrement importante (Bentley et al. 2002). Les deux extrémités du chromosome comportent toutefois des télomères qui sont liés covalentiellement à des protéines le protégeant de la dégradation (Bao & Cohen 2003). La taille du génome des streptomycètes varie de 7 à environ 12 Mb en fonction de l'espèce considérée. À titre d'exemple le génome d'*Escherichia coli* comporte environ 4,6 Mb et celui de *Bacillus subtilis* 4,2 Mb. Cette taille exceptionnelle reflète la prédisposition génétique des *Streptomyces* à s'adapter aux nombreuses variations des conditions environnementales auxquelles ces bactéries doivent faire face dans leurs biotopes. D'ailleurs chez l'espèce modèle *Streptomyces coelicolor*, plus de 12 % des ORFs du génome codent pour des régulateurs transcriptionnels dont la plupart sont prédits comme étant impliqués dans la perception de stress et de stimuli environnementaux (Bentley et al. 2002).

### 1.1.2 Rôle des *Streptomyces* dans la nature

Les *Streptomyces* sont des organismes ubiquistes. En effet, les facultés d'adaptation de ces bactéries leur ont permis de coloniser différentes niches écologiques telles que les sols, les milieux aquatiques (dont les milieux marins), ou encore les milieux karstiques (grottes calcaires). Néanmoins, le biotope naturel de la majorité des *Streptomyces* reste le sol, où ils représentent plus de 5 % de la flore microbienne (Janssen 2006). La faculté qu'ont ces microorganismes immobiles à coloniser les sols provient de caractéristiques morphologiques et physiologiques acquises tout au long de leur



**Figure 1: Morphologie des bactéries du genre *Streptomyces***

**A.** Vue macroscopique d'une colonie de *Streptomyces coelicolor* produisant de l'actinorhodine (antibiotique de pigmentation bleue) en milieu solide. La colonie présente un aspect duveteux dû à la nature filamenteuse des hyphes de la bactérie. **B.** Vue en microscopie électronique à balayage des hyphes aériens en cours de différenciation en chaînes de spores. **C.** Vue en microscopie optique d'un amas de filaments de *Streptomyces* évoluant en milieu liquide.

Nom	Activité biologique	Espèce productrice
Acide clavulanique	Inhibiteur de $\beta$ -lactamases	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Actinomycine	Antibiotique/ antifongique/ antitumorale	<i>S. parvulus</i> , <i>S. anulatus</i> <i>S. antibioticus</i>
Amphotéricine B	Antifongique	<i>S. nodosus</i>
Avermectine	Anthelminthique	<i>S. avermitilis</i>
Bléomycine	Antibiotique/ Antitumorale	<i>S. verticillus</i>
Chloramphénicol	Antibiotique	<i>S. venezuelae</i>
Daptomycine	Antibiotique	<i>S. roseosporus</i>
Doxorubicine	Antitumorale	<i>S. peucetius</i>
Echinomycine	Antibiotique/ Antitumorale	<i>S. echinatus</i>
Hygromycine B	Antibiotique	<i>S. hygrosopicus</i>
Néomycine	Antibiotique	<i>S. fradiae</i>
Nystatine	Antifongique	<i>S. noursei</i>
Pristinamycine	Antibiotique	<i>S. pristinaespiralis</i>
Rapamycine	Immunosupresseur/ antifongique	<i>S. hygrosopicus</i>
Spiramycine	Antibiotique	<i>S. ambofaciens</i>
Streptomycine	Antibiotique	<i>S. griseus</i>
Tacrolimus	Immunosuppresseur	<i>S. tsukubaensis</i>
Tétracycline	Antibiotique	<i>S. aureofaciens</i>
Thaxtomine	Herbicide	<i>S. scabies</i>

**Table 1: Liste de quelques métabolites secondaires d'intérêt produits par différentes espèces de *Streptomyces*.**

Tableau adapté de (Arias et al. 2011; Barka et al. 2016)

évolution. En effet, les *Streptomyces* se développent sous forme d'un mycélium végétatif formant un réseau ramifié leur permettant de capter plus efficacement les nutriments environnants. En condition de carence nutritionnelle ou face à différents stress biotiques ou abiotiques, ils développent un mycélium aérien qui va se différencier en chaînes de spores assurant la préservation et la dissémination de l'espèce (voir point 1.2). Par ailleurs, les adaptations physiologiques des *Streptomyces* à la vie dans le sol résident notamment dans le large éventail d'hydrolases extracellulaires qu'ils sécrètent. Ces enzymes leur permettent de lyser et ainsi d'assimiler des molécules aussi complexes et variées que la lignine, la pectine, la chitine, le xylane, la cellulose, la kératine, le latex ainsi que certains composés aromatiques (Chater et al. 2010). On comprend donc aisément l'importance de ces bactéries dans le recyclage et la minéralisation des composés organiques résiduels des sols.

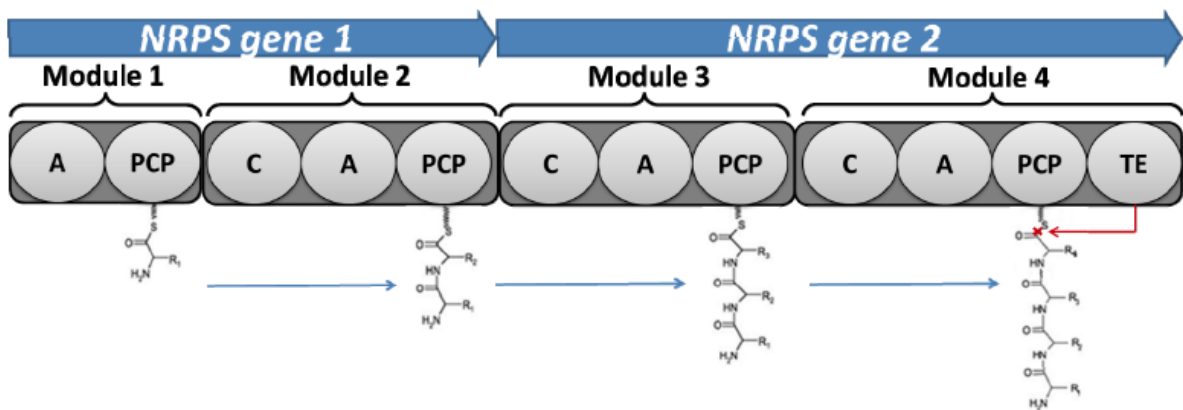
La vie dans le sol implique toutefois une cohabitation avec de nombreux autres organismes tels que les invertébrés et les végétaux mais aussi les autres bactéries et champignons avec lesquelles les *Streptomyces* partagent leur niche écologique. Cette cohabitation nécessite également de nombreuses adaptations. L'adaptation physiologique sans doute la plus remarquable des *Streptomyces* est probablement leur capacité à produire de nombreux métabolites spécialisés, qualifiés erronément de 'secondaires'. En effet, il semble de plus en plus probable que la grande diversité des molécules bioactives produites par les *Streptomyces* résulte de la longue évolution de ces bactéries au contact des autres protagonistes du sol (Seipke et al. 2012).

### **1.1.3 Métabolisme secondaire**

Bien que la majorité des gens n'aient jamais entendu parler des *Streptomyces*, chacun d'entre nous a déjà été en contact avec eux ou tout du moins avec un de leurs métabolites secondaires. En effet, l'odeur caractéristique de terre humide que l'on peut sentir après une pluie ou lorsque l'on fait du jardinage est causée par la géosmine, un des nombreux métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* (Gerber & Lechevalier 1965). En effet, ce genre bactérien est bien connu des industriels pour le nombre et la diversité impressionnants des molécules bioactives qu'ils sécrètent dont notamment des antibiotiques, des antitumoraux, des immunosuppresseurs ou encore des herbicides (Table 1). Près de deux tiers des métabolites secondaires d'origine microbienne ainsi que 70 % des antibiotiques utilisés en médecine sont produits par diverses espèces de *Streptomyces* (Bérdy 2005).

#### **1.1.3.1 Synthèse des métabolites secondaires**

Chez les bactéries Gram positives, il existe plusieurs types de métabolites secondaires que l'on distingue notamment sur base des monomères utilisés pour leurs synthèses et des complexes



**Figure 2: Représentation schématique d'un NRPS à quatre modules**

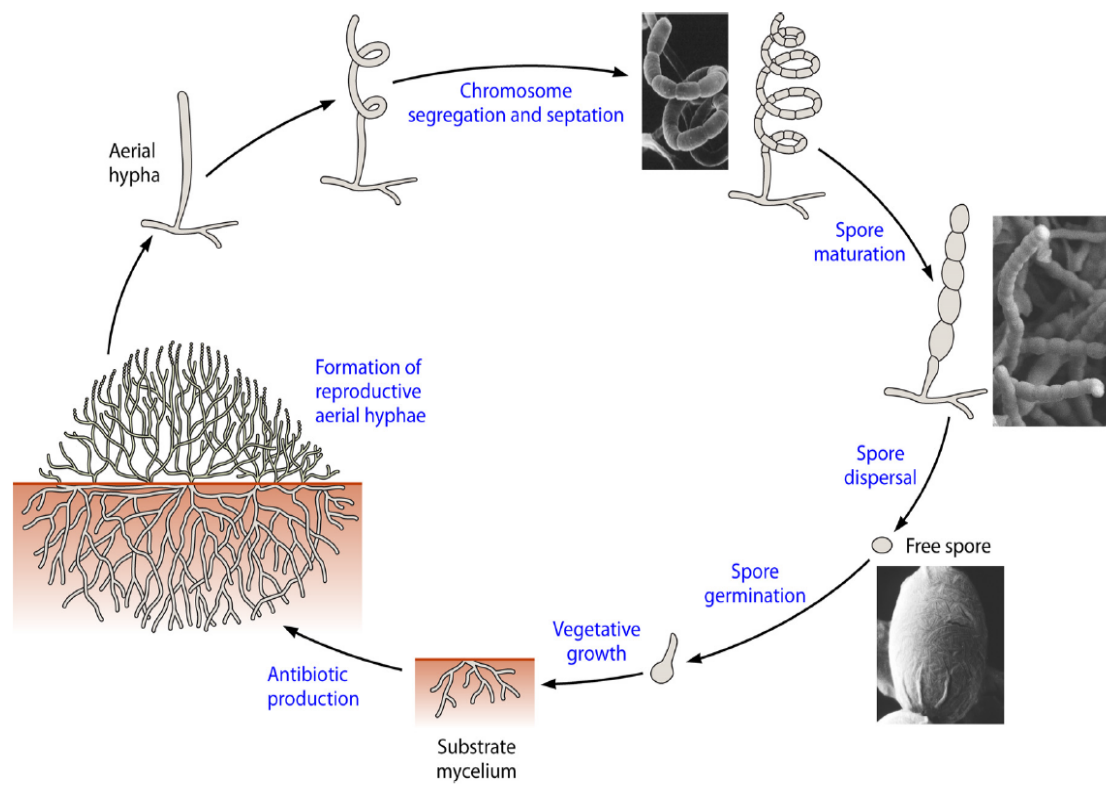
Le NRPS présenté est composé de quatre modules dont les deux premiers (1 et 2) sont codés par un premier gène (NRPS gène 1) et les deux derniers (3 et 4) par un second gène (NRPS gène 2). A l'exception du module 1, chaque module d'un NRPS possède au moins trois domaines catalytiques. 1) Un domaine d'adénylation (A) qui sélectionne un acide aminé spécifique et l'active en le transformant en amino acyl adénylate. 2) Le domaine de thiolation (PCP pour Peptidyl Carrier Protein) qui lie covalentiellent l'acide aminé activé à la synthétase par l'intermédiaire d'un bras phosphopantetheinyl. Et 3) le domaine de condensation (C) qui catalyse la formation d'un lien peptidique entre deux acides aminés liés au niveau de deux modules adjacents. Le dernier module du NRPS contient un domaine thioestérase (TE) qui, en fin de synthèse, permet de décrocher le métabolite secondaire de la synthétase (Arias et al. 2011).

enzymatiques qui assemblent ces monomères entre eux. On retrouve les polycétides (PK) synthétisés par des polycétides synthétases (PKS) à partir d'acyl-coenzyme A, les peptides non ribosomiques (NRP) synthétisés par des synthétases de peptides non ribosomiques (NRPS) à partir d'acides aminés et enfin les bactériocines qui sont des peptides synthétisés par la voie classique des ribosomes à partir d'acides aminés. On retrouve également des métabolites hybrides constitués à la fois de structures peptidiques et polycétidiques, synthétisés par des complexes enzymatiques hybrides PKS-NRPS (Arias et al. 2011). C'est notamment le cas de la bléomicine qui est un agent anticancéreux synthétisé par *Streptomyces verticillus* (Du et al. 2000).

Les PKS et NRPS sont de grosses protéines multimodulaires dont chaque domaine possède une activité enzymatique catalysant l'élongation ou la modification du métabolite secondaire synthétisé. Une représentation schématique d'un système NRPS est présentée à la Figure 2. Les gènes codants pour ces gros complexes enzymatiques sont regroupés au sein de larges clusters qui peuvent notamment abriter les systèmes de transport et les mécanismes de résistances aux métabolites synthétisés, mais également les régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression de l'ensemble de ces gènes. Chez les *Streptomyces*, la grande majorité des métabolites secondaires est synthétisée à partir de systèmes PKS, NRPS et PKS-NRPS. En effet, les bactériocines isolées chez les *Streptomyces* sont peu nombreuses et ne présentent généralement pas d'activité antibiotique. C'est le cas du peptide SapB qui est une bactériocine de classe I (ou lantibiotique) nécessaire à l'émergence des hyphes aériens lors de la différenciation morphologique des *Streptomyces* (voir point 1.2)(Arias et al. 2011).

#### **1.1.3.2 Rôles des métabolites secondaires dans la nature**

Les métabolites secondaires sont souvent définis comme étant des molécules n'ayant pas de fonctions vitales directes pour les bactéries qui les produisent. Cette définition n'est cependant applicable que sous certaines conditions en laboratoire et est donc sujette à controverse. En effet, il est difficile de connaître les fonctions biologiques associées à ces métabolites « spécialisés » dans l'environnement d'origine du microorganisme. Effectivement la majorité des études qui ont permis d'isoler de nouveaux métabolites secondaires se focalisent souvent sur les propriétés bioactives de ces molécules à forte concentration et dans le but d'une exploitation industrielle, ne se préoccupant que trop rarement du rôle de celles-ci dans la nature. Par exemple, il a longtemps été considéré que les antibiotiques étaient uniquement utilisés comme armes chimiques par les bactéries afin d'éliminer leurs concurrents. Cependant, cette vision très anthropocentrique du monde bactérien est de plus en plus contestée. En effet, plusieurs études indiquent que, aux concentrations rencontrées dans l'environnement, ces composés ne présentent pas les activités



(Barka et al. 2016)

**Figure 3: Cycle de vie des *Streptomyces***

antibiotiques que nous leur connaissons (Firn & Jones 2000; Davies 2006; Bérdy 2005; Bernier & Surette 2013). Ces molécules semblent au contraire impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation morphologique, l'équilibre redox et la communication intercellulaire (Bernier & Surette 2013). Cette capacité qu'a une même molécule de véhiculer un message inducteur à de faibles doses et inhibiteur à de fortes doses est connu sous le nom d'hormèse (Calabrese & Baldwin 2003; Mattson & Calabrese 2009). L'étude de ce phénomène d'abord très controversé pourrait permettre la compréhension de nombreux processus physiologiques chez les procaryotes.

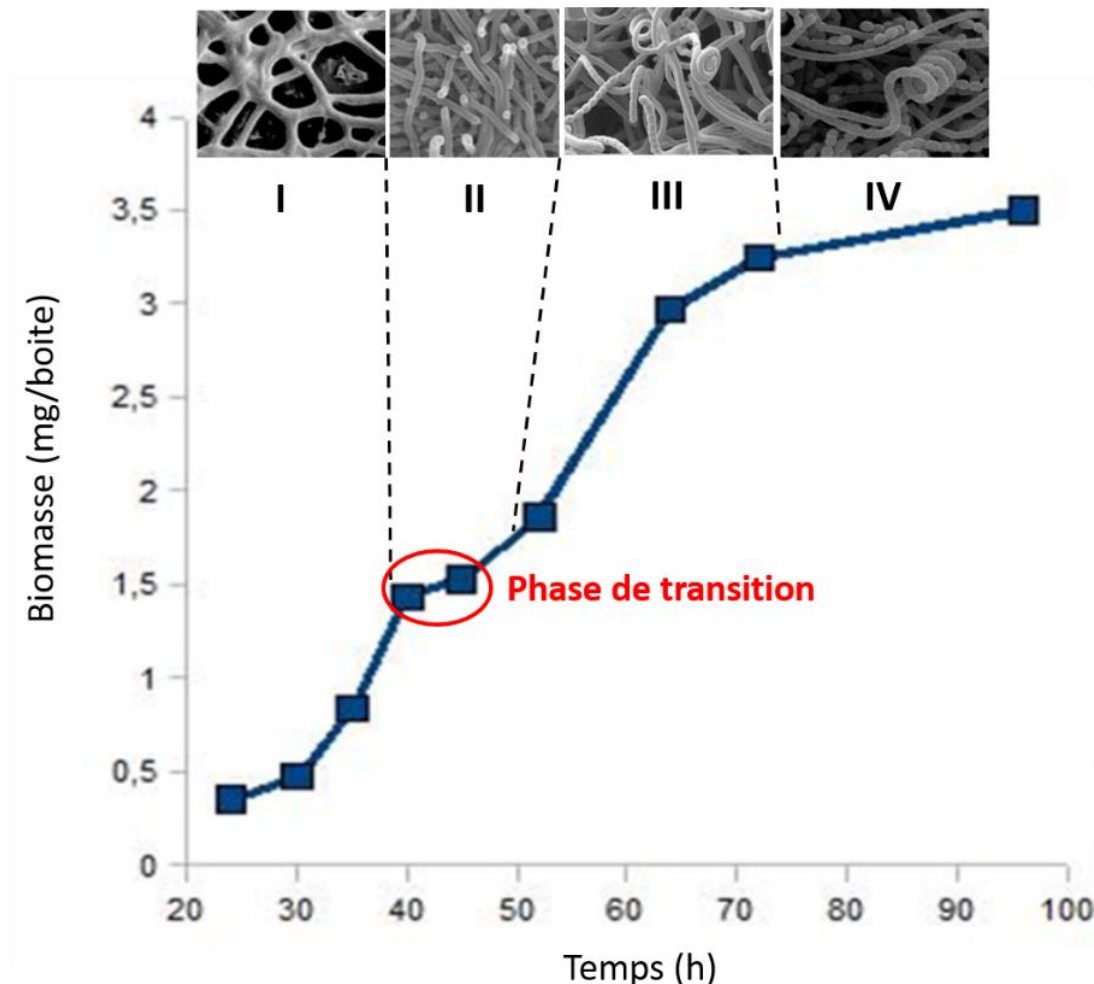
Chez les *Streptomyces*, les métabolites secondaires sont également à la base de nombreuses interactions symbiotiques. En effet, bien que les *Streptomyces* aient souvent été considérés comme étant uniquement des organismes saprophytes participant activement à la dégradation de la matière organique morte, il semble de plus en plus évident que ce genre bactérien est aussi fortement impliqué dans de nombreuses interactions avec les plantes, les champignons ou encore les animaux (Seipke et al. 2012).

## **1.2 Cycle de vie et développement**

La morphologie de ces bactéries immobiles résulte d'une série d'adaptations survenues au cours de l'évolution en vue d'accroître au maximum leurs chances de survie dans un quelconque milieu tellurique. C'est pourquoi le cycle de vie des *Streptomyces* est assez complexe (Figure 3). Il débute par la germination d'une spore contenant une copie unique du génome. Le tube de germination fait ensuite place à un vaste réseau de filaments très ramifiés appelé mycélium végétatif (ou mycélium substrat). Ce dernier est constitué d'hyphes polynucléés pouvant croître rapidement par extension des extrémités de la paroi cellulaire. Survient ensuite une étape de différenciation morphologique conduisant à la formation d'un second type de cellules filamenteuses émergeant verticalement du substrat : le mycélium aérien (ou mycélium reproducteur) (Chater 1972). Après un temps de croissance, ces hyphes aériens vont s'incurver avant de subir un cloisonnement à intervalles réguliers aboutissant à la formation de spores contenant chacune une copie unique du génome (Wildermuth & Hopwood 1970). Arrivées à maturation, les spores seront dispersées afin d'assurer la pérennité de l'espèce et recommenceront un cycle de vie complet lorsque les conditions environnementales le permettront à nouveau (Kieser et al. 2000).

### **La phase de transition**

On appelle phase de transition le moment durant lequel survient le déclenchement de la différenciation du mycélium végétatif en mycélium aérien. Simultanément à cette différenciation morphologique a lieu un processus de différenciation physiologique lequel permet à la bactérie de



**Figure 4: Courbe de croissance de *Streptomyces* en milieu solide**

Courbe de croissance de l'espèce modèle *Streptomyces coelicolor* sur milieu solide R2YE. La croissance des *Streptomyces* peut être divisée en quatre grandes phases que sont : I) la première phase de croissance exponentielle durant laquelle la bactérie se développe sous forme de mycélium végétatif, II) la phase de transition au cours de laquelle le mycélium végétatif subit une lyse intense (mort cellulaire programmée) qui marque le début des phénomènes de différenciation. La différenciation morphologique se traduit par l'apparition des hyphes aériens (extrémités blanches sur l'image de microscopie électronique correspondant à la phase II) tandis que la différenciation physiologique se traduit par la production de métabolites secondaires. III) la seconde phase de croissance exponentielle qui correspond principalement à la croissance des hyphes aériens et enfin, IV) la phase stationnaire durant laquelle les hyphes aériens se différencient en chaînes de spores.



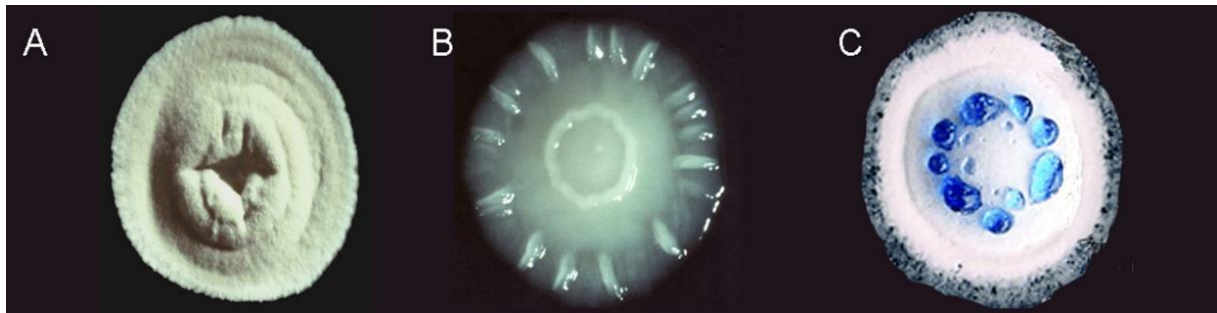
passer du métabolisme primaire (assurant les fonctions vitales de la bactérie) au métabolisme secondaire durant lequel sont produits les métabolites spécialisés (Bibb 2005; van Wezel & McDowall 2011). Si l'ensemble des mécanismes impliqués dans le déclenchement de ces deux processus de différenciation sont encore mal compris, ils semblent tous deux survenir suite à un événement commun de mort cellulaire programmée (Miguélez et al. 1999). En effet, il semble qu'à la suite d'un stress, par exemple lorsque les réserves nutritives locales s'amenuisent, la colonie subit un phénomène de mort cellulaire programmée induisant la lyse de la majorité des hyphes végétatifs. Les composés cellulaires libérés suite à cette lyse serviraient alors de sources nutritives pour les hyphes végétatifs survivants, ceci leur permettant de disposer de l'énergie nécessaire pour se différencier en mycélium reproducteur afin d'assurer la pérennité de l'espèce (Méndez et al. 1985; Manteca et al. 2011). Cette lyse intensive durant la phase de transition correspond à la courte période de ralentissement observée sur la courbe de croissance des *Streptomyces* en milieu solide (Figure 4).

### 1.2.1 Les gènes impliqués dans le développement des *Streptomyces*

Le programme développemental des *Streptomyces* est régulé par de nombreux gènes eux-mêmes activés ou réprimés par de nombreux facteurs environnementaux. Ces réseaux de régulation sont extrêmement complexes et ne sont toujours pas clairement élucidés actuellement (McCormick & Flärdh 2012; Ruiz et al. 2010; Barka et al. 2016).

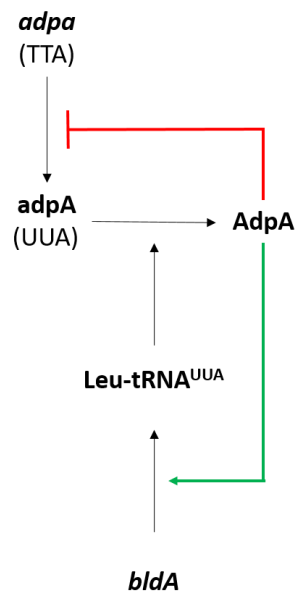
#### 1.2.1.1 Les gènes « *bald* » et « *white* »

Initialement, les gènes intervenant lors des différentes étapes du développement chez les *Streptomyces* ont été identifiés suite à l'observation phénotypique de deux types de mutants obtenus par mutagenèse aléatoire : les mutants « bald » et les mutants « white » (Figure 5). Les mutants « bald » (*bld*) sont incapables de former le mycélium aérien et présentent donc un phénotype lisse contrairement au caractère 'hirsute' de celui des colonies sauvages, d'où l'appellation « bald » (chauve) (Merrick 1976). Les mutants « white » (*whi*) sont capables de produire un mycélium aérien, mais sont en revanche incapables d'achever le processus de maturation des spores. Leur appellation 'white' résulte de leur incapacité à produire le polycétide attribuant la coloration grise caractéristique des spores (Chater 1972; Wildermuth & Hopwood 1970). Bien que les gènes *bld* et *whi* aient été identifiés sur base des caractéristiques morphologiques de souches mutantes, certains se sont également révélés être directement impliqués dans le métabolisme secondaire chez ce genre bactérien. Ceci souligne à nouveau le lien qui existe entre les différenciations morphologique et physiologique chez les *Streptomyces* (Barka et al. 2016). La majorité des gènes *bld* et *whi* codent pour diverses protéines (facteurs sigma, anti-sigma, facteurs de



**Figure 5 : Phénotypes de la souche sauvage, d'un mutant *bld* et d'un mutant *whi* de *S. coelicolor* sur milieu riche.**

La souche sauvage de *S. coelicolor* (A) présente un aspect duveteux et grisâtre dû à la présence d'hyphes aériens différenciés en chaînes de spores. Le mutant *bld* (B) présente un phénotype lisse suite à son incapacité à produire le mycélium aérien tandis que le mutant *whi* (C) produit des hyphes aériens incapables de se différencier en chaînes de spores et présente donc un aspect duveteux de coloration blanche dû à l'absence du pigment gris des spores. Les gouttelettes bleues à la surface de la colonie du mutant *whi* sont constituées d'actinorhodine qui est un des antibiotiques pigmentés produits par *S. coelicolor*. Notons que l'émergence des hyphes aériens nécessite notamment l'intervention de trois classes de protéines que sont les rodelines, les chapelines, et le peptide SapB qui tapissent la surface des hyphes (et des spores). En effet, ces protéines jouent le rôle de surfactant en diminuant la tension superficielle du milieu et permettent ainsi aux hyphes aériens de croître verticalement par rapport à la surface du substrat (McCormick & Flärdh 2012).



**Figure 6: Schéma de la boucle de rétroaction entre *bldA* et AdpA**

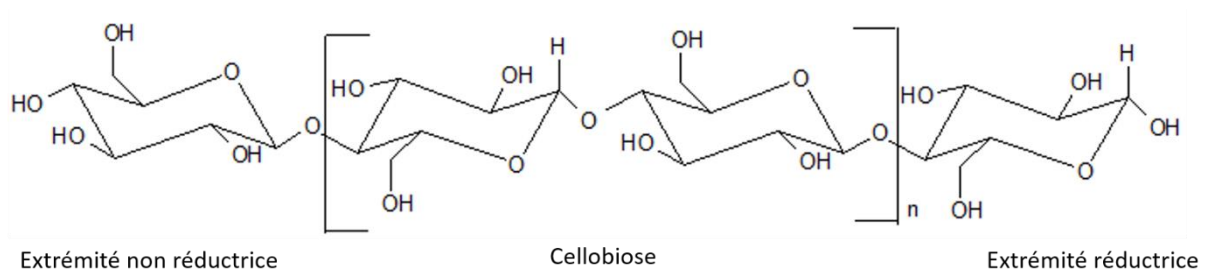
Une fois le gène *bldA* transcrit en Leu-tRNA<sup>UUA</sup>, ce dernier permet la traduction de l'ARNm de AdpA. AdpA va alors activer la transcription de *bldA* et réprimer sa propre transcription.

transcription, ...) intervenant dans la régulation de l'expression de nombreux autres gènes dont les protéines interviennent dans les différents stades du développement des *Streptomyces*. Étant donné l'extrême complexité des réseaux de régulation faisant intervenir les gènes *bld* et *whi*, nous ne décrivons ici que les exemples particuliers des gènes *bldA* et *bldH* qui permettront d'interpréter certains résultats présentés au cours de ce travail.

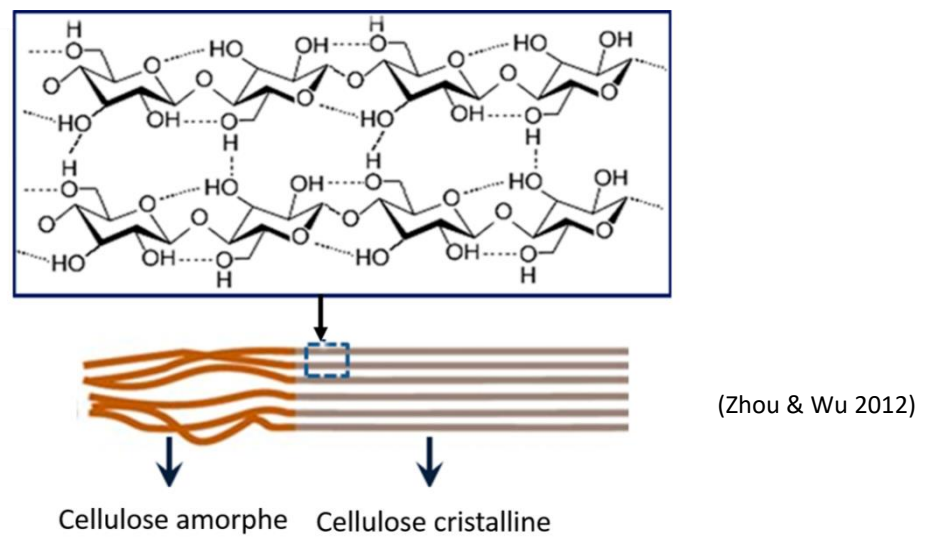
#### 1.2.1.1.1 Les gènes *bldA* et *bldH*

Chez les *Streptomyces*, le gène *bldA* code pour le seul ARN de transfert (ARNt) capable de traduire en leucine le codon UUA d'un ARN messager. Le génome de ce genre bactérien étant très riche en G-C (>70%), la probabilité de rencontrer le codon TTA dans une séquence codante est extrêmement faible. En effet, chez l'organisme modèle *S. coelicolor*, seuls 145 gènes contiennent un codon TTA sur les 7825 que compte son génome. En tant que seul ARNt capable de traduire le codon rare UUA, *bldA* constitue donc un régulateur post-transcriptionnel contrôlant la traduction de nombreuses protéines. Étant donné que la majorité des codons TTA sont localisés dans les gènes codants pour des protéines intervenant dans la différenciation physiologique et morphologique, *bldA* s'avère être un élément clé du développement chez les streptomycètes. En effet, l'analyse de 144 clusters de gènes de biosynthèses de métabolite secondaire chez différentes espèces de *Streptomyces* a montré que 110 d'entre eux possèdent au minimum un gène contenant un codon TTA. De plus, les gènes contenant ce codon rare codent souvent pour une protéine indispensable au bon fonctionnement de l'ensemble des acteurs du cluster. Par exemple, chez *S. coelicolor* le cluster *act* est responsable de la synthèse de l'actinorhodine (antibiotique) tandis que le cluster *red* regroupe les gènes de biosynthèse des prodiginines (antibiotique, antinéoplasique). Ces deux clusters sont respectivement dépendants des activateurs transcriptionnels ActII-ORF4 et RedZ dont les gènes contiennent tous deux un codon TTA. Ainsi, la traduction de ces deux activateurs, la transcription des gènes qu'ils contrôlent et *in fine* la biosynthèse de l'actinorhodine et des prodiginines sont directement dépendantes de la présence de l'ARNt synthétisé à partir de *bldA* (Hackl & Bechthold 2015).

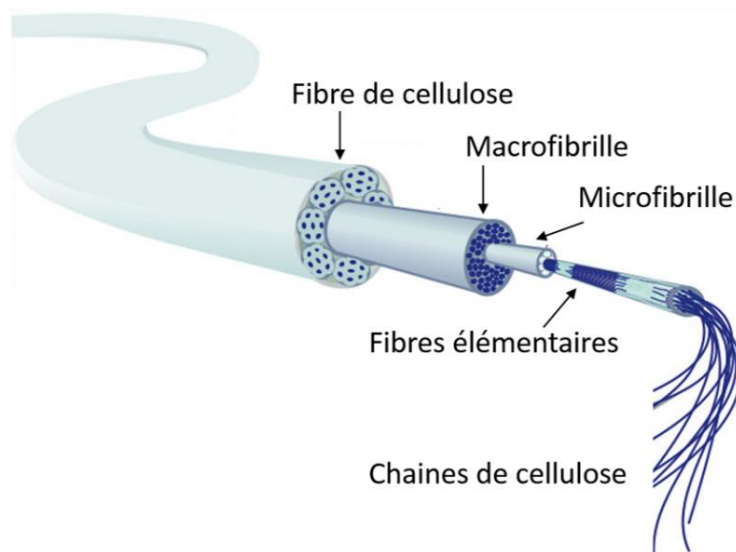
L'implication de *bldA* dans la différenciation morphologique des *Streptomyces* provient quant à elle de la présence d'un codon TTA dans un autre gène *bld* bien conservé codant pour le régulateur transcriptionnel AdpA (gène *adpA* ou *bldH*) qui lui est directement impliqué dans la différenciation morphologique chez *S. coelicolor*, *S. griseus*, et *S. lividans*. Notons également qu'une fois traduit, AdpA active la transcription de *bldA* ce qui génère une boucle de rétroaction entre ces deux acteurs (Figure 6). Enfin, l'expression de *bldA* ne survient que tardivement au cours du développement des *Streptomyces*. En effet, l'accumulation de l'ARNt débute au moment de la différenciation morphologique pour atteindre un pic qui coïncide avec l'augmentation des protéines traduites à partir d'un gène contenant un codon TTA (Hackl & Bechthold 2015).



**Figure 7: Structure chimique d'une chaîne de cellulose**



**Figure 8: Structure chimique de la cellulose cristalline**



<http://www.jrs.eu>

**Figure 9: Organisation d'une fibre de cellulose**

### 1.3 Métabolisme du carbone

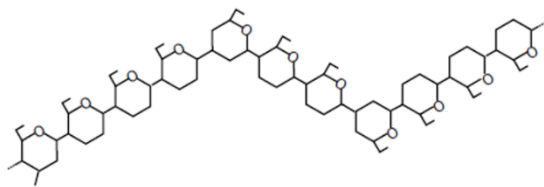
Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des *Streptomyces* évoluent dans le sol où ils participent activement à la dégradation de la matière organique morte. Cet environnement dont les sources nutritives sont principalement issues de la dégradation des végétaux est en conséquence un milieu riche en carbone, mais relativement pauvre en azote et en phosphate (Hodgson 2000). Cependant, cette abondance en sources de carbone ne signifie pas pour autant que cette dernière est directement accessible. En effet, le carbone d'origine végétale peut se présenter sous de nombreuses formes dont la plupart sont des polymères qui ne sont pas immédiatement utilisables par les microorganismes. Effectivement, la paroi pectocellulosique commune à toutes les cellules végétales est principalement constituée de polysaccharides de structure que sont la cellulose, les hémicelluloses et les pectines, mais également de protéines et de lignine. Les proportions et les structures de ces différents constituants varient grandement en fonction du type et/ou de l'âge des cellules végétales (Alberts et al. 2002). Au niveau des organes de réserves, on observe par ailleurs d'autres polysaccharides extrêmement abondants stockés au sein des cellules tels que l'amidon ou l'inuline.

Dans cette partie du manuscrit, nous décrivons les principaux polymères d'origine végétale ainsi que les différentes enzymes responsables de leur dégradation et enfin les systèmes de transport permettant leur internalisation au sein du microorganisme. Nous décrivons ensuite les systèmes contrôlant l'expression de ces différents acteurs chez les *Streptomyces*.

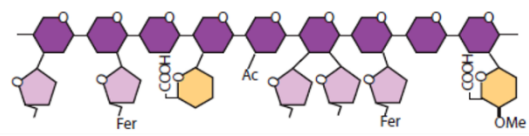
#### 1.3.1 Les polymères d'origine végétale

##### La cellulose

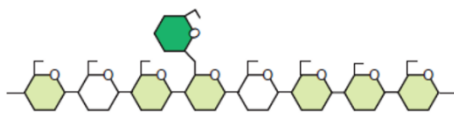
La cellulose est le principal constituant de la biomasse végétale et la source de carbone la plus abondante sur terre. En fonction de l'espèce ou du tissu végétal considéré, elle représente entre 35 et 50 % du poids sec de la plante (Lynd et al. 2002). La cellulose est un long polymère linéaire constitué de plusieurs milliers d'unités D-glucoses reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4 (Figure 7). Néanmoins structurellement le monomère de base de ce polysaccharide est le cellobiose qui consiste en deux unités de D-glucose reliés par une liaison  $\beta$ -1,4. Dans la nature, la cellulose est retrouvée sous forme cristalline ou au contraire sous forme amorphe et bien souvent sous forme d'un mélange des deux. La cellulose cristalline est la forme la plus organisée de ce polymère (Figure 8). En effet durant la synthèse des longues chaînes de cellulose, une trentaine d'entre elles s'assemblent de manière très organisée en créant de nombreuses liaisons hydrogènes et de van der Waals pour former des fibres élémentaires de celluloses de 3 à 5 nm de diamètre. La multitude de liaisons faibles créées entre les chaînes de cellulose rendent la structure de ces fibres élémentaires si dense que même l'eau ne peut les



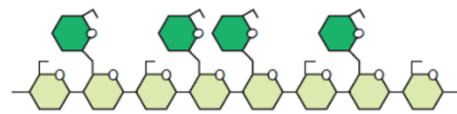
**$\beta$ -(1,3-1,4)-glucanes**



**Glucuronoarabinoxylane**



**Galactoglucomannane**



**Galactomannane**



D-glucose



D-mannose



D-galactose



Acide glucuronique



L-arabinose



D-xylose

**Figure 10 : Illustration de différents types d'hémicelluloses**

Figure adaptée de (Scheller & Ulvskov 2010)

pénétrer. Ces fibres élémentaires s'assemblent ensuite entre elles pour former des microfibrilles de cellulose allant jusqu'à 20 nm de diamètre qui à leur tour se réunissent en unités plus larges que sont les macrofibrilles qui forment finalement les fibres de cellulose que l'on retrouve au niveau de la paroi pectocellulosique (Figure 9) (Lynd et al. 2002; Álvarez et al. 2016).

### Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides ramifiés allant de plusieurs centaines à quelques milliers d'unités osidiques. Elles sont constituées d'une longue chaîne linéaire d'oses reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4 en configuration équatoriale sur laquelle viennent se greffer différents résidus glucidiques. Cependant les  $\beta$ -(1,3-1,4)-glucanes sont une exception au sein des hémicelluloses car leur chaîne principale est constituée de résidus cellotriosyl et cellotétraosyl<sup>1</sup> reliés par des liaisons  $\beta$ -1,3 (Figure 10) (Scheller & Ulvskov 2010).

Les hémicelluloses sont classées en fonction du monosaccharide prédominant dans la structure linéaire. Ainsi on distingue les **xylanes** dont la chaîne principale est constituée de D-xyloses, les **mannanes** constitués de D-mannoses, les **xyloglucanes** constitués de D-glucose, les **glucomannanes** constitués de D-glucose et de D-mannoses. Chacune de ces classes d'hémicelluloses peut encore être divisée en fonction des autres monomères tels que le D-xylose, le D-galactose, le L-arabinose, le L-fucose, ou encore l'acide glucuronique qui viennent se brancher sur la structure linéaire. Par exemple, une chaîne de xyloses reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4 en configuration équatoriale sur laquelle est branché de l'acide galacturonique et de l'arabinose porte le nom de glucuronoarabinoxylane. Il existe ainsi une très grande variété d'hémicelluloses dont l'abondance varie en fonction du groupe d'espèces végétales ainsi qu'en fonction du type de cellule (Scheller & Ulvskov 2010).

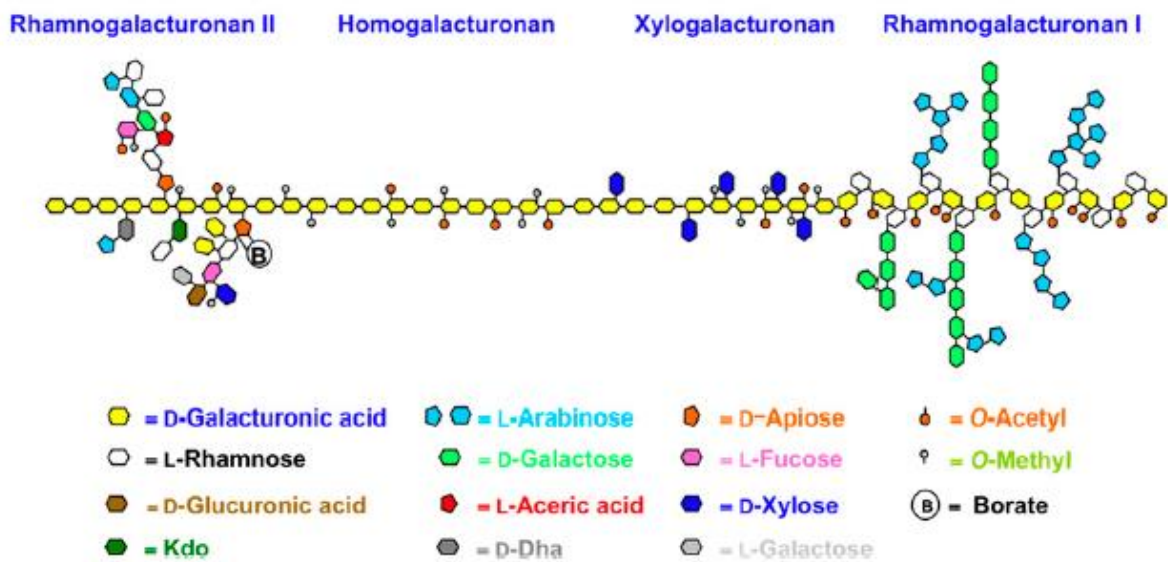
Le rôle principal des hémicelluloses est de réaliser des ponts entre les microfibrilles de cellulose afin de renforcer la structure de la paroi végétale. Les hémicelluloses interagissent avec les microfibrilles de cellulose par l'intermédiaire de ponts hydrogènes, mais sont également enchevêtrées dans les microfibrilles durant la cristallisation de la cellulose (Scheller & Ulvskov 2010).

### Les pectines

Les pectines sont une famille de polysaccharides complexes majoritairement constitués de résidus d'acides galacturoniques. On les retrouve principalement au niveau de la paroi primaire des dicotylédones et monocotylédones à l'exception des graminées. On en retrouve en abondance dans certains fruits comme le citron ou encore la pomme comme l'a si bien souligné Jean-Claude van Damme.

---

<sup>1</sup> cellotriosyl et cellotétraosyl = respectivement trois et quatre unités de D-glucose reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4



**Figure 11: Représentation de la structure des pectines**

Les quatre différents types de pectines sont représentés. Kdo : acide 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonique; DHA : acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarique (Harholt et al. 2010).



Les pectines sont classées en quatre groupes (Figure 11): 1) Les homogalacturonanes (HG), qui représentent environ 65 % des pectines, sont des homopolymères d'acides galacturoniques (reliés par des liaisons  $\alpha$ -1,4) non ramifiés. Dans la paroi, les HG interagissent entre eux par des ponts salins par intermédiaire d'ions calcium et participent ainsi à la rigidification de la paroi. 2) Les xylogalacturonanes sont des HG dont certains résidus d'acides galacturoniques sont reliés à un résidu de xylose. 3) Les rhamnogalacturonanes de type I dont la chaîne principale souvent ramifiée est formée par la répétition du disaccharide constitué d'acide galacturonique et de rhamnose reliés par une liaison  $\alpha$ -1,2, et enfin 4) Les rhamnogalacturonanes de type II dont la chaîne principale est celle des HG et dont les ramifications sont des polysaccharides à 8 ou 9 (Voragen et al. 2009; Atmodjo et al. 2013).

### **L'amidon**

L'amidon est le principal polysaccharide de réserve chez les végétaux. Il s'accumule au niveau d'organites spécialisés que sont les amyloplastés que l'on retrouve majoritairement dans les organes de réserve tels que les graines, les racines, les tubercules ou encore les fruits. On en retrouve également en moindre proportion sous forme de granules au niveau des chloroplastes des feuilles. L'amidon est constitué de deux homopolymères de D-glucoses reliés par des liaisons  $\alpha$ -1,4 : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est un long polymère peu ramifié présentant une structure en hélice  $\alpha$ . L'amylopectine est constituée d'une longue chaîne principale qui arbore de longues ramifications tous les 24 à 30 résidus glucose. Ces ramifications sont reliées à la chaîne principale par des liaisons  $\alpha$ -1,6.

### **La lignine**

La lignine est un polymère de monolignols<sup>2</sup> que l'on retrouve principalement au niveau de la paroi secondaire des plantes vasculaires et herbacées où elle peut représenter jusqu'à 30 % des constituants. Le rôle de la lignine est d'augmenter la rigidité, mais également de protéger les polysaccharides de la paroi pectocellulosique de l'hydrolyse par les pathogènes (Lebo et al. 2001).

## **1.3.2 Les enzymes catalysant la dégradation des polysaccharides**

Au cours de l'évolution, la diversité et la complexité des polysaccharides d'origine végétale n'ont cessé de croître. L'apparition d'une si grande variété de polysaccharides a contraint les microorganismes à multiplier leurs systèmes d'utilisation de ces sources de carbone. Les microorganismes ont ainsi développé de nombreuses enzymes spécifiques permettant de dégrader ces sucres complexes en sucres plus simples (mono-, di- ou oligosaccharides) assimilables *via* des systèmes de transport spécifiques permettant l'internalisation du sucre au sein du cytoplasme. Sur ce

---

<sup>2</sup> Il existe trois principaux monolignols qui sont tous synthétisés à partir de phénylalanine : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique.

### Box 1 : Classification des enzymes

**Le nombre EC (Enzyme Commission number)** est un code numérique de 4 nombres mis en place par le NC-IUBMB pour permettre la classification de toutes les enzymes en fonction de la réaction chimique qu'elles catalysent. Le premier nombre représente un des six types de réactions catalysées par les enzymes. À titre d'exemple les hydrolases (qui catalysent le clivage d'une liaison chimique en présence d'eau) portent le code EC 3. Les nombres suivants donnent chacun une indication de plus en plus précise sur le mécanisme et la nature de l'enzyme et de son substrat (McDonald & Tipton 2014). Par exemple le code des glycosylhydrolases (GHs) est EC 3.2, si la GH hydrolyse une liaison O- ou S-glycosidique: EC 3.2.1 si c'est une liaison N-glycosidique : EC 3.2.2. La précision apportée par le quatrième nombre permet d'octroyer un nom général à l'enzyme par exemple les bêta glucosidases qui hydrolysent la liaison  $\beta$  reliant un glucose à un glucide ou à un aglycone porte le code : EC 3.2.1.21. Cependant, il est possible que certaines enzymes multifonctionnelles (ayant plusieurs types de substrats) possèdent plus d'un code EC (Henrissat 1991). Cette classification n'octroie un code EC qu'aux enzymes dont les fonctions ont été déterminées biochimiquement. Cette nomenclature ne permet donc pas la classification des enzymes encore non caractérisées et peut également évoluer pour une enzyme en partie caractérisée.

**La classification CAZy** (Carbohydrate Active Enzymes). La banque de données CAZy classe l'ensemble des enzymes synthétisant, modifiant ou dégradant les glucides. Cette classification fait la distinction entre cinq grands groupes d'enzymes actives sur les glucides : les glycosylhydrolases (GHs), les glycosyltransferases (GTs), les polysaccharides lyases (PLs), les carbohydrates estérases (CEs) et les enzymes dites à activités auxiliaires (AAs). Chacun de ces groupes d'enzymes est subdivisé en familles, voir en sous-familles, dans lesquelles les enzymes sont classées sur base de leur de séquence en acides aminés. Les membres d'une même famille présentent une similarité de séquence significative et au moins un membre de la famille doit avoir été caractérisé biochimiquement. Contrairement à la nomenclature EC, la classification CAZy permet donc de classer les enzymes encore non caractérisées et donne ainsi une information relativement précise sur l'activité potentielle de cette enzyme (Lombard et al. 2014). La classification CAZy a été mise en place pour pallier aux 'faiblesses' de la classification de la NC-IUBMB. De nos jours ces deux classifications complémentaires sont très utilisées. Nous ne décrivons ici que les enzymes qui participent à la dégradation des polysaccharides à savoir les groupes GHs, les PLs et les AAs.

**Les glycosylhydrolases ou glycosidases (GHs)** constituent le plus grand groupe d'enzymes actives sur les sucres. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons O-, N- ou S- glycosidiques entre deux glucides (holosides) ou entre un glucide et un aglycone (hétéroside). Dans la plupart des cas l'hydrolyse de la liaison glycosidique est catalysée par deux acides aminés dont les chaînes latérales sont respectivement acide et basique/nucléophile (Davies & Henrissat 1995). Le code EC des GHs débute toujours par EC 3.2. En plus des classifications EC et CAZy, les GHs peuvent être classées en exo- ou endo- glycosylhydrolases. Ces préfixes désignent respectivement la capacité d'une GH - dont le substrat est composé d'au moins 4 liaisons glycosidiques - à hydrolyser celui-ci à partir d'une extrémité (réductrice ou non) ou, au contraire, en clivant à l'intérieur de la chaîne de glucide. Enfin, une dernière classification dite mécanistique permet de distinguer les GHs qui conservent ou non la configuration anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) du glucide hydrolysé. Cette dernière classification est généralement peu utilisée.

**Les polysaccharides lyases (PLs)** constituent un groupe d'enzymes responsables du clivage (sans eau) des polysaccharides contenant des acides uroniques. Ces enzymes sont donc principalement impliquées dans la dégradation de la pectine. Le code EC des PLs débute toujours par EC 4.2.2.

**Les enzymes dites à activités auxiliaires (AAs)** regroupent les LPMOs (Lytic Polysaccharides Mono Oxygénases), mais également les enzymes responsables de la dégradation du polymère non glucidique qu'est la lignine. Les LPMOs sont des enzymes contenant du cuivre et qui sont capables de dégrader les formes cristallines des polysaccharides récalcitrants comme la cellulose et la chitine qui sont peu accessibles aux autres enzymes (Frandsen et al. 2016). Les membres très variés des AAs sont généralement des enzymes à activité oxydoréductase (EC1) et plus rarement des hydrolases (EC3).

En plus des 5 grands groupes et des différentes familles et sous famille de ces groupes, l'ensemble de ces enzymes peut également être distingué entre elles au sein d'une même famille sur base des modules de liaison aux sucres (CBM pour Carbohydrate Binding Module) qu'elles contiennent (Lombard et al. 2014).

point les *Streptomyces* se distinguent de la plupart des autres bactéries. En effet, le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* a permis d'identifier plus d'une centaine d'ORFs codant pour des hydrolases potentielles ainsi que plus d'une cinquantaine de systèmes de transport des sucres (Bentley et al. 2002; Bertram et al. 2004). Depuis, d'autres génomes d'espèces de *Streptomyces* ont été séquencés et cette tendance se confirme au sein de ce genre bactérien (Lombard et al. 2014). Ce sont ces adaptations physiologiques qui font des *Streptomyces* des microorganismes spécialisés dans l'utilisation d'une grande variété de sources de carbone et qui rendent ce genre bactérien particulièrement adapté à la vie dans le sol.

Actuellement les enzymes dégradant les polysaccharides peuvent être classées selon deux nomenclatures majeures. La classification *via* un code EC (Enzyme Commission) qui s'applique à toutes les enzymes du monde vivant et la classification CAZy qui s'applique uniquement aux enzymes actives sur les glucides (voir Box 1). Puisque les résultats majeurs obtenus durant cette thèse font principalement intervenir le système cellulolytique de *S. scabies*, nous ne décrivons ici que les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose chez les *Streptomyces*.

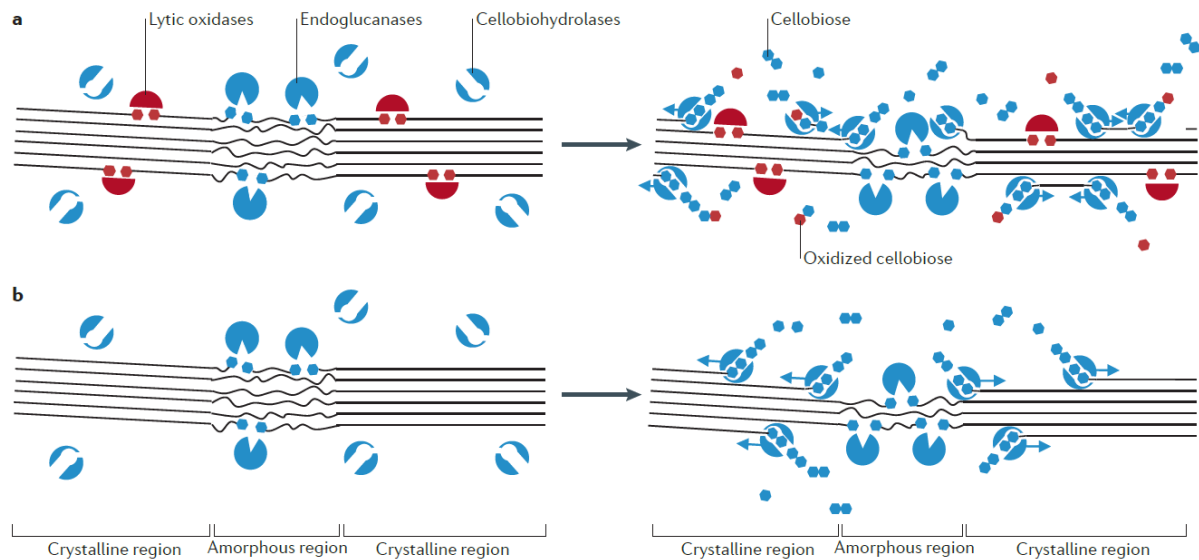
#### **1.3.2.1 Les cellulases chez les *Streptomyces***

En fonction de leur mode de vie aérobie ou anaérobie, les bactéries utilisent des systèmes cellulolytiques différents. En effet, la dégradation de la cellulose chez les bactéries anaérobies est généralement menée par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique appelé cellulosome. Celui-ci reprend de nombreuses enzymes agissant en synergie dans la dégradation des différents polymères de la paroi des végétaux. Ces enzymes sont regroupées et ancrées au niveau de la surface extérieure de la cellule par l'intermédiaire d'une protéine appelée scaffoldine (Bayer et al. 2004; Fontes & Gilbert 2010). En revanche, chez les bactéries aérobies comme les *Streptomyces*, la dégradation de la cellulose a généralement lieu suite à la sécrétion dans le milieu environnant d'enzymes lytiques solubles (Lynd et al. 2002).

Il existe quatre types d'enzymes intervenant dans la dégradation de la cellulose chez les *Streptomyces* dont trois types pour les glycosylhydrolases (EC 3.2) et un type pour les monooxygénases (EC 1).

##### **1.3.2.1.1 Les glycosylhydrolases :**

**Les endocellulases** (EC 3.2.1.4) sont capables d'hydrolyser aléatoirement la liaison  $\beta$ -1,4 entre deux résidus de glucose situés à l'intérieur d'une chaîne de cellulose. Ces enzymes permettent donc de générer des celloextrins et multiplient ainsi le nombre d'extrémités accessibles aux exocellulases. On retrouve les endocellulases dans les familles GH 5, 6, 8, 9, 12 et 51.



**Figure 12: Schématisation de l'hydrolyse de la cellulose par les différentes cellulases**

Les endoglucanases catalysent l'hydrolyse des liaisons glucidiques à l'intérieur des chaînes de cellulose des régions amorphes. Ces enzymes génèrent donc deux extrémités (une réductrice et une non réductrice). Les LPMOs (Lytic oxidases) sont capables de cliver les liaisons glucidiques au sein de la cellulose cristalline. Elles génèrent ainsi une extrémité oxydée et une extrémité non oxydée. L'ensemble des extrémités générées par les endoglucanases et les LPMOs permettent aux cellobiohydrolases (et autres exocellulases) de générer du cellobiose qui sera à son tour clivé par les  $\beta$ -glucosidases (Mba Medie et al. 2012).

**Les exocellulases** (familles GH 6 non réductrice et GH 48 réductrice) sont des enzymes processives qui hydrolysent la liaison  $\beta$ -1,4 entre deux résidus glucoses situés à l'extrémité d'une chaîne de cellulose. Certaines exocellulases sont capables de dégrader la cellulose microcristalline. En fonction du produit généré par la catalyse on distingue : 1) les cellodextrinases ou 4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolases (EC 3.2.1.74) qui génèrent du glucose et 2) les cellobiohydrolases ou 4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolases qui génèrent du cellobiose à partir des extrémités réductrices (EC 3.2.1.176) ou non réductrices (EC 3.2.1.91) des chaînes de cellulose.

**Les  $\beta$ -glucosidases** ou  $\beta$ -D-glucosides glucohydrolases (EC 3.2.1.21, famille GH1 ou GH3) sont responsables de l'hydrolyse du cellobiose en deux molécules de glucose. Certaines  $\beta$ -glucosidases peuvent également générer du glucose à partir de l'extrémité non réductrice des très courtes cellodextrines (de 3 à 6 résidus glucoses) (Lynd et al. 2002; Mba Medie et al. 2012).

#### **1.3.2.1.2 Les LPMOs (Lytic Polysaccharides MonoOxygenases)**

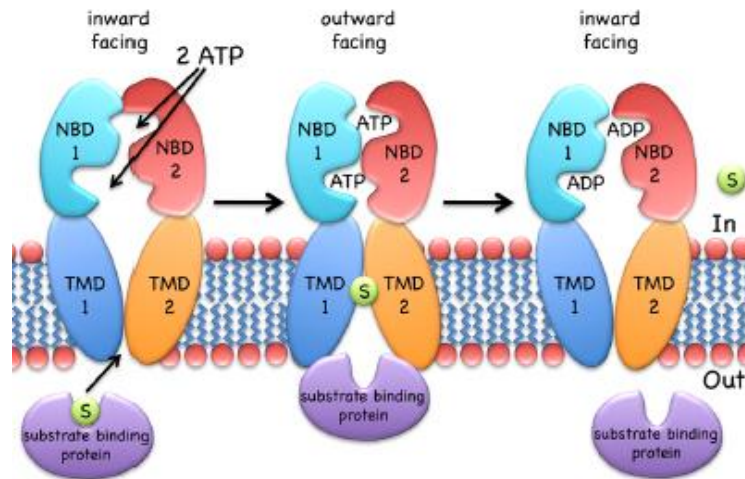
Les LPMOs participant à la dégradation de la cellulose appartiennent à la famille AA10 anciennement classée dans les protéines de la famille CBM33. Ces enzymes sont capables de cliver les liaisons glucidiques à l'intérieur des chaînes de cellulose cristalline. Ce clivage génère deux nouvelles extrémités (une oxydée et une non oxydée) accessibles aux exocellulases. Ces enzymes augmentent considérablement le rendement d'hydrolyse de la cellulose cristalline par les GHs (Figure 12). La première LPMO capable d'hydrolyser la cellulose a été identifiée chez *Streptomyces coelicolor* (Corrêa et al. 2015; Forsberg et al. 2011).

### **1.3.3 Les systèmes de transport des sucres chez les *Streptomyces***

Une fois la dégradation des polysaccharides initiée, les mono- et oligosaccharides de petite taille doivent être importés à l'intérieur de la bactérie afin d'être métabolisés. Cependant, la double couche de phospholipide de la membrane cytoplasmique constitue une barrière hermétique pour la majorité des molécules chargées et/ou polaires. Le transport de ces molécules a donc lieu au travers de la membrane par l'intermédiaire de différents transporteurs protéiques. De plus, lorsque ce transport est réalisé à l'encontre d'un gradient de concentration (comme c'est souvent le cas), il nécessite de l'énergie qui peut être fournie par une réaction enzymatique comme l'hydrolyse de l'ATP ou encore par l'énergie potentielle d'un gradient chimique. Dans cette partie nous présenterons les différents types de transporteurs de sucres identifiés chez les *Streptomyces*.

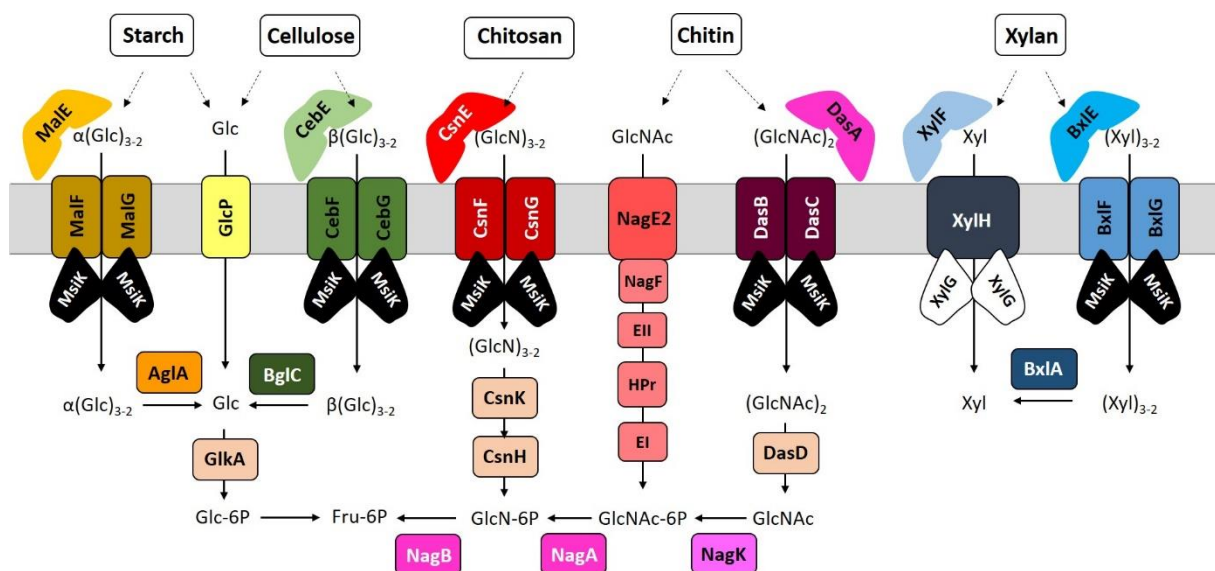
#### **1.3.3.1 Les ABC transporteurs**

Les ABC transporteurs (ABC pour ATP Binding Cassette) sont des transporteurs membranaires que l'on retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Ils sont divisés en deux groupes selon qu'ils effectuent un transport du milieu extracellulaire vers le cytoplasme



**Figure 13: Mécanisme de transport d'un substrat par un ABC transporteur de type importeur**

Lorsque le substrat est présent dans le milieu extracellulaire, il est tout d'abord fixé par la lipoprotéine qui lui est spécifique. D'autre part, la liaison de deux molécules d'ATP au niveau des NBDs cytoplasmiques va entraîner leur dimérisation. Ce mouvement va se transmettre au niveau des TMDs qui vont adopter une position créant une cavité vers l'extérieur de la cellule. La lipoprotéine soluble complexée au substrat va ensuite interagir avec la partie extracytoplasmique de la perméase qui lui est associée et lui transférer le substrat. Ensuite, l'hydrolyse des deux molécules d'ATPs par les NBDs va permettre au transporteur de retrouver sa position initiale et ainsi libérer le substrat dans le cytoplasme (Wilkins 2015).



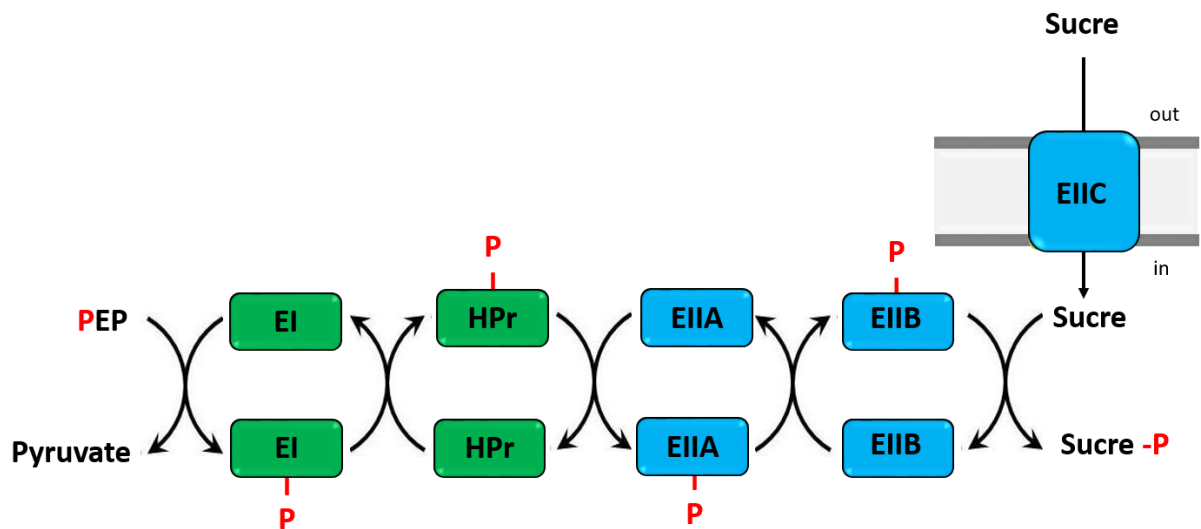
**Figure 14: Différents systèmes de transport de sucres identifiés chez les *Streptomyces***

(importeur) ou, au contraire, du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule (exporteur). Les importeurs sont également subdivisés en deux (voir trois) groupes en fonction de leur structure et de leur mécanisme d'action. Les bactéries utilisent aussi bien les importeurs que les exporteurs tandis que les ABC transporteurs des eucaryotes sont pratiquement tous des exporteurs (Wilkins 2015).

Tous les ABC transporteurs sont constitués de quatre unités fonctionnelles dont deux domaines transmembranaires (TMDs) et deux domaines de liaison à un nucléotide (NBDs) (généralement l'ATP). Les deux TMDs forment un canal (la perméase) qui permettra le transport du substrat au travers de la membrane tandis que les deux NBDs fourniront l'énergie nécessaire au transport en hydrolysant l'ATP. En condition physiologique, un ABC transporteur fonctionne généralement à l'encontre d'un gradient de concentration et dans une seule direction (importeur ou exporteur). C'est pourquoi, lors d'un transport et afin d'éviter les reflux, les TMDs adoptent alternativement une position créant une cavité vers l'extérieur puis vers l'intérieur de la cellule (Figure 13). Les importeurs possèdent également une protéine soluble extracellulaire dont le rôle est de capturer le substrat puis de le transmettre aux domaines transmembranaires (Figure 13, Figure 14)(Wilkins 2015).

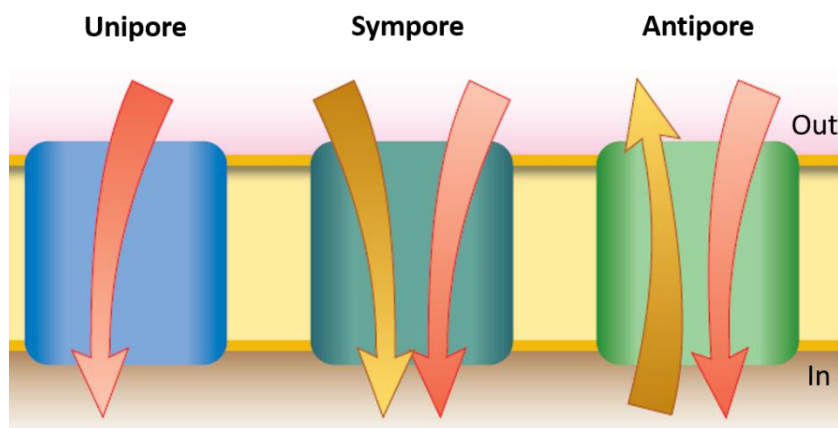
Dans le cas des importeurs de sucre chez les *Streptomyces*, les unités fonctionnelles sont généralement dissociées (une protéine par domaine). En effet, TMD1 et TMD2 sont deux protéines transmembranaires différentes tandis que les deux NBDs sont deux copies d'une même ATPase. Les TMDs ainsi que la protéine soluble extracellulaire sont généralement spécifiques d'un même substrat et sont d'ailleurs souvent codées au sein d'un même opéron. Les NBDs quant à eux peuvent faire partie de l'opéron ou être codés ailleurs dans le génome.

Le séquençage du génome de *Streptomyces coelicolor* a permis d'identifier 81 séquences codantes pour des perméases d'ABC transporteurs impliqués dans le transport de sucres, d'oligopeptides et de nucléosides, mais également dans l'exportation de métabolites (Bertram et al. 2004). Ce nombre est 5 à 10 fois plus élevé que chez la plupart des autres bactéries. Cette famille de transporteurs représente à elle seule plus de 85% des systèmes de transport de sucres chez les *Streptomyces* (Bertram et al. 2004). Parmi les ABC-transporteurs responsables de l'import de sucres nous citerons le système MalEFG responsable du transport du maltose (van Wezel et al. 1997), CebEFG pour les cellooligosaccharides (Schlösser et al. 1999), BxlEFG pour les xylooligosaccharides (Tsuji et al. 2004), DasABC pour le N-N'-diacetylchitobiose (Saito et al. 2007), NgcEFG pour la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et les N-acetylchitoooligosaccharides (oligosaccharides de GlcNAc) (Xiao et al. 2002), et enfin CsnEFG pour les chitoooligosaccharides (oligosaccharides de glucosamine) (Viens et al. 2015) (Figure 14). Notons que les trois dernières lettres correspondent respectivement à la lipoprotéine extracellulaire liant le substrat et aux deux protéines transmembranaires formant la perméase. Enfin, une seule ATPase est associée à la majorité des ABC transporteurs responsables de



**Figure 15: Représentation schématique du système de phosphotransférase des sucres**

Le phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) est successivement transféré de l'enzyme I (EI) à la protéine HPr (Heat stable protein) qui le cède ensuite au domaine EIIA puis EIIB qui le transférera finalement au sucre lors de son entrée *via* EIIC. Les différents domaines de l'enzyme II (EII) peuvent être présents au sein d'une même protéine ou être codés par des protéines différentes.



**Figure 16 : Représentation schématique des transporteurs de la superfamille MSF**

Les flèches rouges indiquent le sens du transport du substrat tandis que les flèches jaunes indiquent le sens du transport de la molécule « aide ». L'intensité des couleurs des flèches indique les différences de concentration des molécules transportées. L'intensité la plus élevée correspond au milieu le plus concentré et l'intensité la plus faible au milieu le moins concentré (Yan 2015).



l'import des sucres. Il s'agit de l'hydrolase MsiK (Multiple Sugar Import Kinase) dont la séquence codante n'est présente dans aucun opéron d'ABC transporteur, mais située ailleurs sur le chromosome (Hurtubise et al. 1995; Saito et al. 2008; Schlösser et al. 1997; Viens et al. 2015).

#### **1.3.3.2 Le système de phosphotransférase des sucres (PTS)**

Le système de phosphotransférase des sucres (PTS) est un système de transport actif uniquement retrouvé chez les bactéries. Le PTS est constitué de deux protéines cytoplasmiques communes EI et Hpr ainsi que de multiples complexes enzymatiques (EII) (Figure 15). Chaque complexe EII est spécifique d'un sucre et est constitué d'au moins 3 domaines A, B et C. Le domaine EIIC est transmembranaire et forme le canal reliant le milieu extracellulaire et le cytoplasme. Les domaines EIIA et EIIB sont cytoplasmiques et interviennent dans la phosphorylation du sucre transporté. Un domaine peut correspondre à une protéine, toutefois plusieurs domaines peuvent être réunis au sein d'une seule protéine. La particularité du PTS est qu'il entraîne la phosphorylation du sucre durant son transport (Postma et al. 1993). Actuellement, le fructose et la N-acétylglucosamine sont les seuls sucres identifiés comme étant transportés par le PTS chez les *Streptomyces* (Rigali et al. 2006; Nothaft et al. 2010; Nothaft et al. 2003).

#### **1.3.3.3 Le transport du glucose chez les *Streptomyces***

Bien que pour la majorité des bactéries le glucose soit transporté et phosphorylé via le PTS, chez les *Streptomyces* l'utilisation du glucose fait intervenir la perméase GlcP et une glucose kinase, GlkA (Ruiz et al. 2010). GlcP est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des MSF (Major facilitator superfamily). Les membres de cette superfamille facilitent le transport d'un substrat à travers la membrane en utilisant l'énergie potentielle d'un gradient chimique. Lorsque le transport s'effectue sur base des différentes concentrations en substrat de part et d'autre de la membrane, on parle d'uniport (Figure 16). Ces uniports favorisent donc simplement la diffusion du substrat au travers de la membrane plasmique. Par contre, lorsque le transport du substrat est couplé au transport d'une autre molécule « aide », la perméase utilisera l'énergie potentielle du gradient de concentration de cette molécule « aide », permettant ainsi au substrat d'être transporté activement contre son propre gradient de concentration. On distingue alors les symports, via lesquels le substrat et la molécule « aide » sont transportés dans le même sens, des antiports au sein desquels les deux molécules sont transportées en sens opposés (Figure 16) (Yan 2015).

La perméase GlcP identifiée chez les *Streptomyces* est un symport glucose/H<sup>+</sup> utilisant l'énergie potentielle du gradient de concentration en protons de part et d'autre de la membrane plasmique pour transporter le glucose au sein du cytoplasme (Van Wezel et al. 2004). Une fois incorporé, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucose kinase GlkA en présence d'ATP (Saito et al. 1998).

### 1.3.4 Régulation génétique des systèmes d'utilisation des sucres chez les *Streptomyces*

À l'image de tous les microorganismes évoluant dans le sol, les *Streptomyces* doivent faire face à de nombreuses fluctuations de la composition des sources nutritives dans leur environnement. Comme nous l'avons vu précédemment, le caractère adaptatif exceptionnel des membres de ce genre bactérien provient du large arsenal génétique dont ils disposent. En effet, les adaptations physiologiques aux différents signaux environnementaux perçus par la bactérie se traduisent par la modification de l'expression de différents gènes. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression génique sont donc des éléments clés faisant le lien entre la perception d'un signal par un microorganisme et la réponse qui y est associée. Nous distinguerons ici les facteurs sigma des autres facteurs de transcription.

#### 1.3.4.1 Les facteurs sigma

Le facteur sigma (SF, sigma factor) est l'unité dissociable d'une ARN polymérase. En effet, cette enzyme est constituée de cinq sous-unités qui forment le cœur fonctionnel de l'enzyme (holoenzyme) auquel vient s'ajouter un SF qui détermine la spécificité de la polymérase. En effet, en reconnaissant spécifiquement un groupe de séquences nucléotidiques dans les régions promotrices de différents gènes cibles, le SF améliore l'affinité de l'ARN polymérase pour ces régions et favorise en conséquence l'initiation de leur transcription. Les bactéries possèdent plusieurs SFs permettant l'expression spécifique de différents groupes de gènes impliqués dans une fonction commune. On retrouve par exemple des SFs contrôlant l'expression des « housekeeping genes » impliqués dans les fonctions essentielles à la bactérie, mais également d'autres SFs dit « à activité extracytoplasmique » (ECF-SF, extracytoplasmique fonction SF) impliqués dans la réponse aux stimuli environnementaux. Chez les *Streptomyces*, on retrouve un très grand nombre de SFs comparativement aux autres bactéries (64 chez *S. coelicolor* et 69 chez *S. scabies* contre 7 chez *Escherichia coli* et 10 chez *Bacillus subtilis*) et plus de la moitié de ces SFs sont de type ECF. Ceci reflète la complexité des systèmes de régulation mis en place chez ce genre bactérien afin de permettre une transcription spécifique à chaque stade de leur cycle de vie et une réponse immédiate et appropriée aux fluctuations nutritionnelles et physico-chimiques de leur environnement (Romero-Rodríguez et al. 2015).

#### 1.3.4.2 Les régulateurs transcriptionnels

Les régulateurs transcriptionnels sont des protéines cytoplasmiques capables d'activer ou de réprimer l'expression d'un ou plusieurs gènes en liant une séquence spécifique de l'ADN double brin (élément *cis*). On distingue ainsi les activateurs des répresseurs transcriptionnels. Les activateurs qui induisent la transcription d'un gène en stabilisant l'ARN polymérase au niveau du promoteur et/ou en entrant en compétition avec un répresseur. Ces derniers inhibent la transcription d'un gène soit 1) en

liant la région promotrice de ce gène et empêchant ainsi l'ARN polymérase d'initier la transcription, 2) en liant un site en aval du promoteur ce qui empêche l'élongation de la transcription, ou 3) en entrant en compétition avec un activateur transcriptionnel (Romero-Rodríguez et al. 2015).

### **Les systèmes à un ou deux composants**

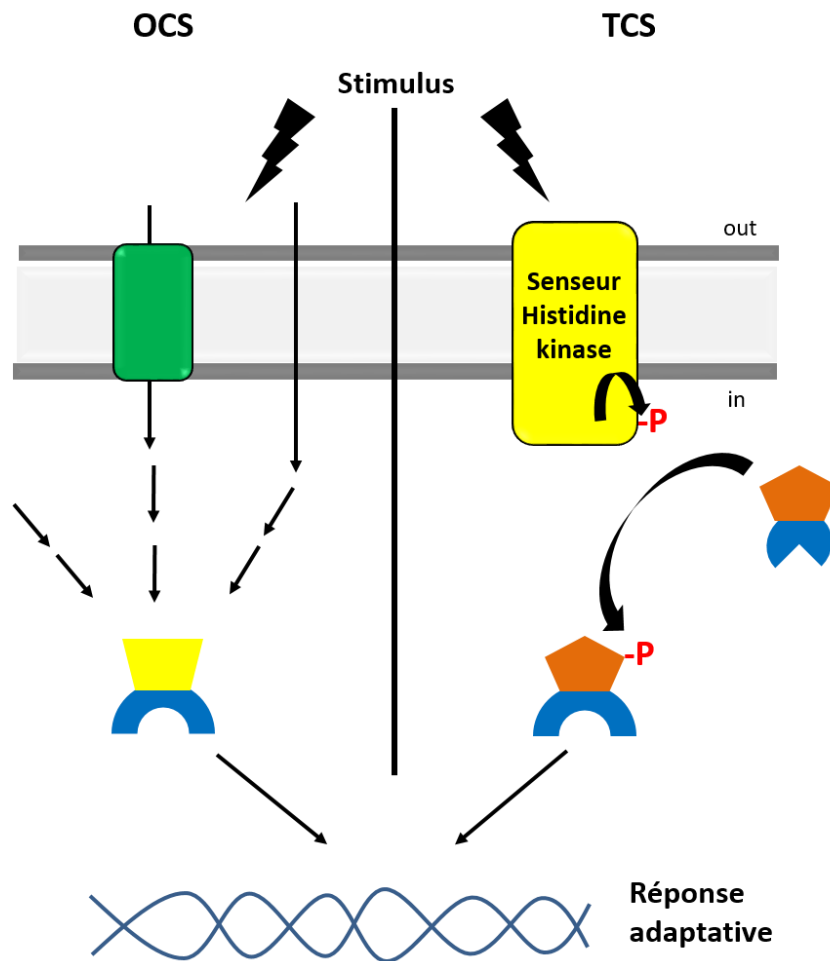
Un régulateur transcriptionnel exerce sa fonction régulatrice seul (système à un composant OCS, one component system) ou en association avec une kinase membranaire (système à deux composants ou TCS, two component system). Dans ce dernier cas lorsque la kinase membranaire perçoit un stimulus environnemental spécifique via son domaine extracellulaire, cela induit l'autophosphorylation de son domaine cytoplasmique qui à son tour peut transférer le groupement phosphate au régulateur transcriptionnel auquel elle est associée (Figure 17). La phosphorylation du régulateur aura pour effet d'activer sa fonction régulatrice (activateur et/ou répresseur) (Podgornaia & Laub 2013). Chez les bactéries, il semble y avoir une corrélation entre l'abondance de TCS et le nombre de stimuli auxquels la bactérie est susceptible d'être exposée dans son environnement. C'est pourquoi ces systèmes à deux composants sont très représentés chez les *Streptomyces* (77 chez *S. coelicolor* et 82 chez *S. scabies*).

Un système à un composant est constitué d'un régulateur transcriptionnel qui perçoit lui-même le stimulus environnemental. Ces régulateurs sont constitués d'un domaine senseur et d'un domaine de liaison à l'ADN. Bien qu'ils ne possèdent pas le domaine de phosphorylation des régulateurs des TCS, ils peuvent toutefois être impliqués dans la perception et la réponse à des stimuli similaires (Romero-Rodríguez et al. 2015).

### **Les régulateurs spécifiques ou globaux**

Les régulateurs transcriptionnels peuvent également être classés en régulateurs globaux ou spécifiques sur base de leur spectre d'action. En effet, les régulateurs spécifiques vont généralement moduler l'expression de gènes présents au niveau d'un même opéron ou d'un même cluster. C'est notamment le cas des activateurs ActII-ORF4 et RedD respectivement responsables de la transcription des gènes de biosynthèse de l'actinorhodine et des prodiginines chez *S. coelicolor*.

De leur côté, les régulateurs globaux sont capables de moduler l'expression de nombreux gènes localisés à différents endroits du génome. Nous citerons en exemple les régulateurs GlnR et PhoP respectivement impliqués dans le métabolisme de l'azote et du phosphate chez les *Streptomyces* (Tiffert et al. 2008b; Sola-Landa et al. 2003). Étant donné la large gamme de gènes contrôlés par les régulateurs globaux, les séquences des éléments *cis* reconnus par ces régulateurs peuvent varier à tel point qu'il est parfois difficile de déterminer une séquence consensus « type » reconnue par un régulateur donné.



**Figure 17 : Représentation schématique des systèmes à un ou deux composants**

Le système à un composant (OCS, one component system) est constitué d'un régulateur transcriptionnel qui perçoit lui-même le stimulus environnemental. Ce stimulus peut être une molécule transportée *via* un transporteur membranaire ou diffusant au travers de la membrane cytoplasmique puis interagit avec le domaine senseur du régulateur. La perception du stimulus par le régulateur engendre une modification conformationnelle du domaine de liaison à l'ADN permettant au régulateur d'induire ou de réprimer l'expression des gènes de réponse au stimulus (Romero-Rodríguez et al. 2015). Dans un système à deux composants (TCS, two component system) un stimulus environnemental entraîne l'autophosphorylation d'une kinase membranaire qui va alors phosphoryler le domaine de phosphorylation d'un régulateur cytoplasmique. La phosphorylation du régulateur aura pour effet d'activer sa fonction régulatrice (Podgornaia & Laub 2013).

Différents régulateurs peuvent contrôler l'expression d'un même gène, de même que plusieurs régulateurs peuvent se contrôler les uns les autres. Ces contrôles croisés augmentent en conséquence la complexité des systèmes de régulation. Ceci est particulièrement vrai chez les *Streptomyces* où la proportion de régulateurs transcriptionnels dans les génomes est particulièrement élevée (en moyenne 10 % des ORFs du génome)(Romero-Rodríguez et al. 2015).

### **Les familles de régulateurs impliqués dans le métabolisme des sources de carbone**

Les facteurs de transcriptions sont classés en différentes familles (près de 50) en fonction de la séquence et de la structure de leurs différents domaines ainsi que sur base de leurs implications dans les différentes fonctions cellulaires. Chez les *Streptomyces*, les régulateurs notamment impliqués dans le métabolisme du carbone appartiennent aux familles AraC, GntR (ex : DasR), LacI (ex : MalR, BxIR et CebR) et ROK (ex : CsnR). Nous décrivons ici les caractéristiques générales des régulateurs de la famille LacI.

Les régulateurs de la famille LacI (du nom du répresseur de l'opéron lactose chez *E. coli*) sont largement représentés dans le monde bactérien où ils contrôlent notamment les systèmes d'utilisation des sucres (gènes codant pour les enzymes cataboliques intra- et extracellulaires et pour les protéines des transporteurs). Ces régulateurs sont généralement des répresseurs transcriptionnels qui inhibent la transcription des gènes qu'ils contrôlent. La répression sera levée en présence d'un inducteur spécifique qui agit en tant qu'effecteur allostérique du répresseur. En effet, une fois lié à son effecteur, le régulateur ne sera plus capable de lier ses éléments *cis*. L'inducteur est généralement le sucre (ou un produit de dégradation de ce sucre) convoité par le microorganisme. Les régulateurs de la famille LacI sont donc constitués de deux domaines. Un domaine de liaison à l'ADN contenant le motif de liaison hélice-coude-hélice (HTH, Helix-Turn-Helix) dans la partie N-terminale, et d'un domaine de liaison à un effecteur allostérique (ligand) spécifique dans la partie C-terminale. Lorsque le régulateur contrôle un ABC transporteur de sucre, son domaine de liaison à l'effecteur présente généralement de nombreuses similitudes structurales avec la lipoprotéine de l'ABC transporteur qu'il contrôle (Romero-Rodríguez et al. 2015).

## **1.4 Implication des sucres dans la différenciation physiologique et morphologique chez les *Streptomyces***

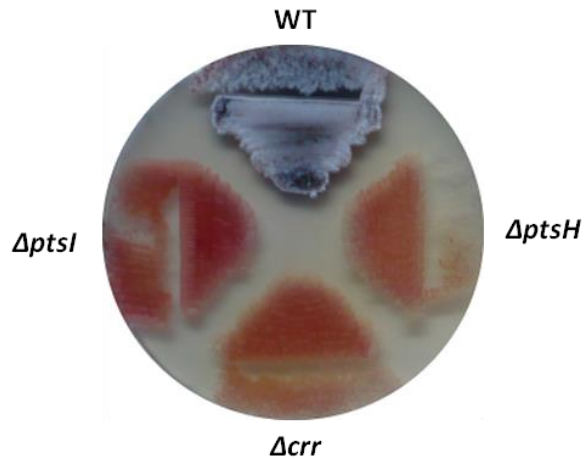
### **1.4.1 Répression catabolique par le glucose**

Le développement chez les *Streptomyces* est directement dépendant de la disponibilité et de la nature des sources nutritives et particulièrement des sources de carbone de leur environnement. En effet, certaines sources de carbone sont capables d'induire ou de réprimer la production de métabolites secondaires et la différenciation morphologique chez les *Streptomyces*. Le processus le

plus couramment observé est lié au phénomène de répression catabolique (RC) par le glucose. En effet, le glucose réprime les systèmes d'utilisation des autres sources de carbone plus complexes et/ou moins facilement métabolisables, mais réprime également la production de nombreux métabolites secondaires chez ce genre bactérien. C'est notamment le cas de la tétracycline chez *Streptomyces aureofaciens*, de la streptomycine chez *Streptomyces griseus*, du chloramphénicol chez *Streptomyces venezuelae* ou encore de la néomycine chez *Streptomyces fradiae* (Ruiz et al. 2010). Nous noterons également que l'ensemble des mutants *bld* (voir point 1.2.1.1) présentent un blocage du développement au stade de mycélium végétatif sur milieu riche en glucose. Cependant, certains de ces mutants retrouvent leur capacité à se développer en présence d'autres sources de carbone alternatives tels que le glycérol, le mannitol ou encore l'arabinose ce qui démontre à quel point l'utilisation du glucose annihile l'induction des deux types de différenciations. Actuellement, les phénomènes de RC par le glucose chez les *Streptomyces* sont toujours mal compris. Le transport du glucose chez les *Streptomyces* s'effectue *via* la perméase GlcP (symporteur) et non *via* le PTS. La RC par le glucose chez les *Streptomyces* ne fait donc pas intervenir les protéines du PTS comme c'est le cas chez les bactéries Gram négatives ou Gram positives pauvres en G-C. Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels la RC par le glucose chez les *Streptomyces* n'aient toujours pas été élucidés, ceux-ci sont toutefois dépendants de l'activité de la glucose kinase GlkA responsable de la phosphorylation du glucose une fois transporté par GlcP.

#### **1.4.2 Implication des protéines générales du PTS dans le développement des *Streptomyces***

Outre leur rôle dans le transport et la phosphorylation de la GlcNAc et du fructose, les trois composantes générales du PTS (EI, HPr et EIIA) se sont révélées être essentielles au déclenchement de la sporulation et la production de métabolites secondaires chez *S. coelicolor* (Rigali et al. 2006). En effet, l'inactivation de chacun des gènes codant pour ces trois protéines chez cette espèce résulte en une abolition complète de la production d'actinorhodine et inhibe également le processus de différenciation morphologique (Figure 18). Il est important de noter que les mutants des gènes *nagF* et *nagE2*, quant à eux spécifiques du transport de la GlcNAc, sont par contre toujours capables de sporuler et de produire des antibiotiques. Le rôle des protéines générales du PTS dans le développement serait donc indépendant de la fonction de transport de GlcNAc ce qui suggère une capacité du transfert du phosphate ou simplement une interaction avec des protéines essentielles du développement.



**Figure 18: Phénotype des mutants du PTS chez *S. coelicolor***

Inhibition de la production d'actinorhodine (antibiotique bleu) et de la sporulation (coloration blanche) suite à l'inactivation des gènes *ptsI* (EI), *ptsH* (HPr) et *crr* (EIIA<sup>Crr</sup>) chez *S. coelicolor* (WT, souche sauvage).

### 1.4.3 N-acétylglucosamine et développement

Une autre source de carbone impliquée dans le développement des *Streptomyces* est la N-acétylglucosamine (GlcNAc). Ce sucre aminé est le monomère de la chitine qui est la source de carbone et d'azote la plus abondante sur terre, mais se retrouve également dans le peptidoglycane de la paroi des bactéries. L'effet de la GlcNAc sur le développement de *S. coelicolor* est dépendant de l'état nutritionnel de l'environnement de la bactérie. En effet, en milieu de culture pauvre en nutriments, la présence de GlcNAc (>10 mM) stimule le développement et induit la production d'antibiotiques. Au contraire, en milieu riche en nutriments, la présence de GlcNAc (>10 mM) inhibe la production d'actinorhodine et bloque le développement de la bactérie au stade de mycélium végétatif (Rigali et al. 2008). Cet exemple illustre comment une même molécule peut véhiculer des messages diamétralement opposés en fonction de l'état nutritionnel de la bactérie. Ainsi la perception de la présence de GlcNAc dans l'environnement de la bactérie lorsque les conditions de croissance sont optimales signifierait que cette molécule proviendrait de l'hydrolyse de la chitine et empêcherait la bactérie de déclencher ses processus de différenciations morphologique et physiologique. Au contraire, lorsque la bactérie se retrouve dans un environnement carencé en nutriments, la présence de GlcNAc signifierait que cette molécule proviendrait de l'autolyse de sa paroi et signalerait à la bactérie que le processus de mort cellulaire a été déclenché et qu'il est temps de se différencier.

La cascade signalétique complète depuis la perception de la GlcNAc jusqu'à l'induction de la production de métabolites secondaires a été décrite chez *S. coelicolor* (Figure 19) (Rigali et al. 2008). Le régulateur central de cette voie est le répresseur transcriptionnel DasR (deficient in aerial and spores formation régulator) qui contrôle, entre autres, l'expression des gènes du PTS responsables du

transport de la GlcNAc (*ptsI*, *ptsH*, *csr*, *nagE2*, *nagF*) (Rigali et al. 2006; Nothaft et al. 2010) mais également l'expression des gènes de biosynthèses de l'actinorhodine et des prodiginines (Rigali et al. 2008). Les deux effets opposés de la GlcNAc sur le développement des *Streptomyces* trouveraient leur origine dans un lien étroit entre les protéines générales du PTS et des gènes du développement. En présence de GlcNAc les protéines du PTS transfèreraient le phosphate du PEP vers la GlcNAc plutôt que vers des protéines impliquées dans le développement (et dont la phosphorylation est évidemment nécessaire pour l'activation de leur fonction).

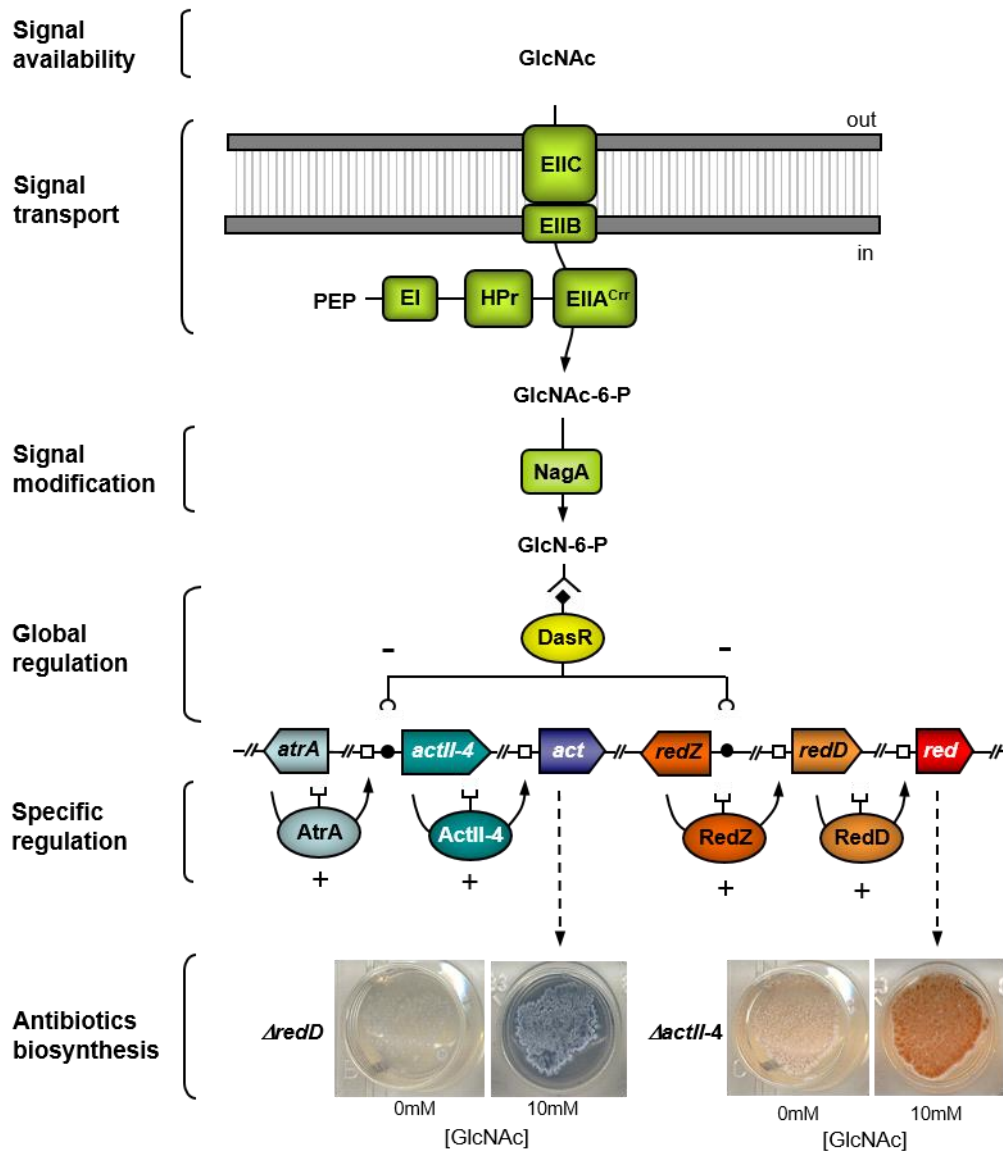
De manière intéressante, la délétion du gène codant pour le régulateur global DasR induit l'expression constitutive d'antibiotiques mais également un blocage du développement au stade de mycélium végétatif sur milieu riche en glucose (Rigali et al. 2006). Le blocage du développement chez ce mutant proviendrait de la perturbation complète du métabolisme primaire induit par la dérégulation des gènes contrôlés directement et indirectement par DasR.

En plus de contrôler l'expression des gènes d'utilisation de la GlcNAc, DasR contrôle entre autre l'expression de l'ABC transporteur DasABC responsable du transport du N-N'-diacétylchitobiose (dimère de GlcNAc, (GlcNAc)<sub>2</sub>) issus de la dégradation de la chitine. De manière intéressante, la chitine n'induit pas de blocage du développement en milieu riche comme c'est le cas de la GlcNAc. L'hypothèse expliquant ce phénomène serait que l'assimilation de la chitine se fait principalement sous forme de (GlcNAc)<sub>2</sub> et non de GlcNAc. Dès lors, le transport de ce dimère *via* l'ABC transporteur DasABC ne solliciterait donc pas les protéines du PTS, et celles-ci seraient toujours capables de transférer le phosphate du PEP à des protéines essentielles du développement. De manière surprenante la délétion du gène codant pour la lipoprotéine DasA chez *S. coelicolor* confère à cette souche un phénotype bald mais également une augmentation de l'activité chitino lytique en milieu riche en glucose (Colson et al. 2008).

#### **1.4.4 Implication du régulateur CebR dans le développement chez *S. griseus***

Ce dernier exemple fait intervenir CebR, le régulateur de l'utilisation de la cellulose et des cellooligosaccharides chez *S. griseus* (Marushima et al. 2009). En effet, ce répresseur transcriptionnel contrôle notamment l'expression des gènes responsables de l'hydrolyse de ce polysaccharide, de la perception et du transport des produits issus de sa dégradation enzymatique. De manière surprenante, la délétion du gène codant pour ce régulateur engendre un blocage du développement de cette espèce au stade de mycélium végétatif sur milieu contenant du lactose (Figure 20). Au contraire, la présence d'une grande concentration en glucose (> 2 % m/v) induit une accélération du développement par rapport à la souche sauvage (Figure 20). Ces observations illustrent de nouveau le lien qu'il existe entre l'utilisation des sources de carbone et la différenciation morphologique chez les *Streptomyces*. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que l'effet sur le développement de la délétion du régulateur CebR





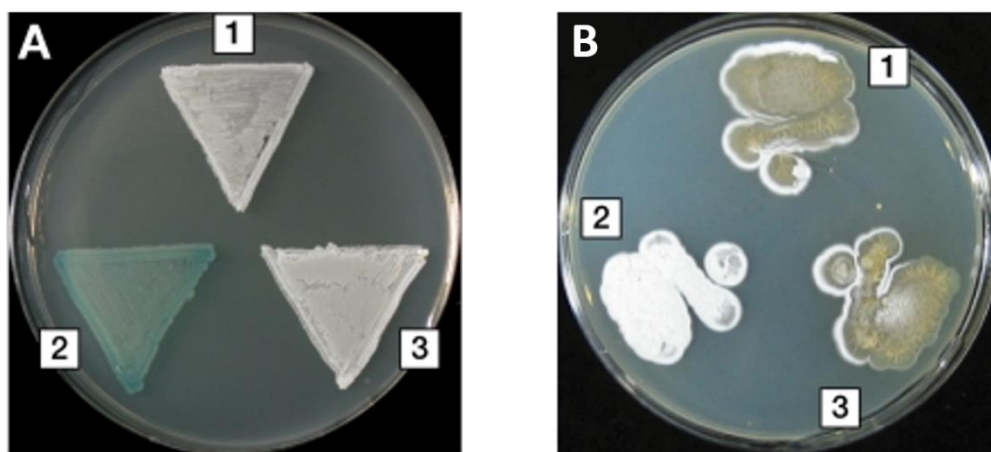
(Rigali et al. 2008)

**Figure 19: Cascade signalétique complète depuis la perception de la GlcNAc jusqu'à la production d'antibiotique chez *S. coelicolor***

Le phosphate du phosphoenol pyruvate (PEP) est successivement transféré de la composante EI du PTS à la protéine HPr qui le cède ensuite à l'enzyme EIIA. Cette dernière transfère le phosphate à NagF (EIIB) qui le cèdera finalement à la GlcNAc lors de son entrée par la perméase NagE2 (EIIC). La GlcNAc-6P résultant de cette phosphorylation est déacétylée par NagA en GlcN-6P qui est l'effecteur allostérique du répresseur transcriptionnel DasR. Une fois lié à la GlcN-6P, DasR sera incapable de lier ses éléments de réponse et donc incapable de réprimer l'expression des gènes qu'il contrôle dont notamment les gènes *actII-ORF4* et *redZ*. Ces deux derniers gènes sont les activateurs transcriptionnels des clusters *act* et *red* regroupant respectivement les gènes de biosynthèses de l'actinorhodine (pigment bleu) et des prodiginines (pigment rouge). Les mutants  $\Delta redD$  (incapable de produire les prodiginines) et  $\Delta actII-ORF4$  (incapable de produire l'actinorhodine) ont été utilisés afin de visualiser la production de chacun des antibiotiques. RedD est un activateur transcriptionnel dont l'expression est activée par RedZ. Cette cascade illustre l'effet de la GlcNAc en condition de carence nutritionnelle (Rigali et al. 2008).

résulterait, comme dans le cas du mutant  $\Delta dasR$ , d'une perturbation complète du métabolisme primaire de la bactérie (Marushima et al. 2009). Les auteurs ont également montré que le régulateur CebR est nécessaire à la RC par le glucose de l'activité  $\beta$ -galactosidase chez *S. griseus* (Figure 20). En effet, en présence de lactose (0,5 %) et de glucose (1%) la souche mutante  $\Delta cebR$  présente une activité  $\beta$ -galactosidase contrairement à la souche sauvage.

Les exemples que nous venons de présenter illustrent comment des sucres, mais également les acteurs protéiques impliqués dans leur perception et leur utilisation, ont un rôle prépondérant dans les processus de différenciations physiologique et morphologique chez les *Streptomyces*. Nous noterons également que ces effets sont souvent dépendants de l'état nutritionnel de l'environnement (milieu de culture) et font donc intervenir de nombreux protagonistes qui rendent l'étude de ces phénomènes particulièrement compliquée.



**Figure 20 : Phénotype du mutant  $\Delta cebR$  de *S. griseus***

A. Milieu IS-GLX contenant 1 % de glucose, 0,5 % de lactose et 0.006 % X-Gal. B. milieu YMP contenant 2 % de glucose. 1) souche sauvage de *S. griseus*, 2) la souche  $\Delta cebR$ , 3) la souche  $\Delta cebR$  complémentée.

## 1.5 La phytopathogénicité chez les *Streptomyces*

Selon l'*American Phytopathological Society*, la pathogénicité désigne la capacité d'un microorganisme à induire une infection chez un hôte sain tandis que la virulence donne une indication sur la sévérité des dégâts engendrés chez l'organisme hôte. La pathogénicité est donc une notion qualitative tandis que la virulence est une notion quantitative (Sacristán & García-Arenal 2008).

Les agents phytopathogènes sont capables d'engendrer une infection chez une ou plusieurs espèces végétales hôtes. En effet dans la plupart des cas un phytopathogène donné infecte

spécifiquement une espèce végétale avec laquelle il est compatible. Il existe cependant des pathogènes capables de coloniser une grande variété de végétaux. La majorité des phytopathogènes résident généralement dans le sol et affectent principalement les tissus souterrains des végétaux comme les racines, les tiges, les stolons ou encore les tubercules. Les symptômes des maladies engendrées par ces organismes sont en grande majorité un pourrissement ou un flétrissement induit par une infection racinaire. Certaines affections peuvent cependant n'affecter que les couches superficielles de l'organe infecté sans pour autant engendrer la mort de l'hôte. Quoi qu'il en soit lorsqu'elles touchent les cultures agricoles ces maladies diminuent considérablement le rendement et la qualité des récoltes ce qui engendre des pertes économiques considérables.

Les agents pathogènes responsables d'infection chez les végétaux sont très nombreux et très diversifiés. On retrouve parmi ces derniers les champignons et les virus qui représentent les plus grands groupes de phytopathogènes présents dans le sol, mais également des nématodes et des bactéries. Parmi ces dernières, les bactéries Gram-négatives sont particulièrement bien représentées avec par exemple *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, certaines espèces de *Pseudomonas* ou encore plusieurs espèces du genre *Xanthomonas* (Mansfield et al. 2012). Chez les bactéries Gram-positives, la phytopathogénicité est principalement retrouvée chez les actinomycètes et plus précisément au sein des genres *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Rhodococcus* et *Streptomyces* (Hogenhout & Loria 2008).

En effet, bien que la majorité des espèces de *Streptomyces* soit saprophyte et/ou symbiotique, quelques espèces se sont révélées être pathogènes. Parmi celles-ci, seules deux espèces sont des pathogènes opportunistes pour l'homme. Il s'agit de *Streptomyces somaliensis* et *Streptomyces sudanensis* qui ont été identifiés comme étant responsables d'abcès douloureux chez l'homme et les bovins (Quintana et al. 2008). Les autres espèces de *Streptomyces* pathogènes sont des phytopathogènes dont l'espèce modèle *Streptomyces scabies* (et autres souches apparentées) qui fera l'objet de la seconde partie de cette introduction.

## 2 *Streptomyces scabies*

### 2.1 Historique : Un microorganisme à l'origine de la gale commune de la pomme de terre

Les premières références à la gale commune de la pomme de terre remontent au début du 19<sup>ème</sup> siècle. Les régions où les cultures de pommes de terre étaient très répandues ont été le théâtre des premières manifestations de cette maladie. Certaines cultures du Yorkshire notamment étaient tellement contaminées que les tubercules étaient invendables (Millard 1923) ce qui reste aujourd'hui le principal inconvénient de cette affection. Durant les années 1800, les causes de la gale commune ont fait l'objet de plusieurs théories. C'est le botaniste écossais John Claudius Loudon qui en 1825 décrit dans « *The Encyclopedia of Agriculture* » les premières tentatives - non satisfaisantes selon lui - d'explication des causes de cette maladie. Il nota entre autres que certains attribuaient cette affection des tubercules au pH alcalin du sol dû à l'ammoniaque provenant du crottin de cheval et d'autres au fait que l'on répandait des cendres de bois sur les terrains de cultures. Près de soixante ans plus tard W.G. Smith émit l'idée que la gale commune était la résultante de l'effet irritant des éléments tranchants ainsi que des graviers présents dans le sol (Millard 1923). C'est finalement au Connecticut (USA) en 1890 que le mycologue Roland Thaxter (Figure 21) isola d'une lésion galeuse d'un tubercule de pomme de terre le microorganisme responsable de la gale commune. Il nomma provisoirement ce dernier *Oospora*<sup>3</sup> *scabies* du fait de la nature filamenteuse de l'organisme identifié (Thaxter 1890). Cependant, les travaux de Thaxter furent peu reconnus du fait de la popularité de la théorie de la cause « mécanique » de la gale commune. Malgré la preuve supplémentaire apportée par Seton et Stewart en 1907 que la gale commune ne pouvait se développer dans un sol stérilisé, il faudra attendre trois études supplémentaires menées dans les années 1914-1915 pour que la communauté scientifique admette qu'un microorganisme était bien à l'origine de la gale commune (Millard 1923).

### 2.2 Taxonomie

La classification du microorganisme isolé par Thaxter a bien évolué depuis sa découverte. En effet, lors d'une réunion de l'association américaine pour l'avancement de la science, G.C. Cunningham plaida pour placer l'organisme responsable de la gale commune dans les « bactéries supérieures » car ne présentant pas les caractéristiques morphologiques du genre *Oospora* et proposa de l'intégrer dans le genre *Streptothrix* (Cunningham 1912). En 1914, alors que la nomenclature des microorganismes semble de plus en plus désorganisée, H.T. Güssow remplaça le pathogène dans le genre *Actinomyces* établi par Harz en 1878 (Güssow 1914). Il faudra attendre les travaux de Waksman et Henrici en 1948

---

<sup>3</sup> Genre appartenant au règne des champignons

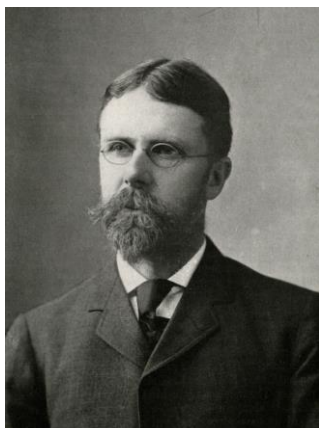
pour voir apparaître la dénomination actuelle de *Streptomyces scabies* (Waksman & Henrici 1948). Actuellement, il existe toujours un désaccord concernant l'épithète « *scabies* » ou « *scabiei* ». Cette dernière est la dénomination officielle déterminée selon les règles de l'ICNP (International Code of Nomenclature of Prokaryotes) (Truper & De'clari 1997; Trüper 2008), mais n'a cependant jamais obtenu la reconnaissance généralisée de la communauté scientifique et agricole et est par conséquent peu utilisée dans la littérature en dehors de la systématique microbienne (Lambert et al. 2007). L'agent responsable de la gale commune fut également répertorié comme appartenant au cluster *Diastatochromogenes* dans lequel on retrouve notamment les espèces de *Streptomyces* suivantes : *S. neyagawaensis*, *S. bottropensis*, *S. diastatochromogenes*, *S. eurythermus*, and *S. griseosporus* (Elesawy & Szabo 1979; D H Lambert & Loria 1989; Healy & Lambert 1991).

## **2.3 Caractéristiques générales de *Streptomyces scabies***

Lambert et Loria ont défini plusieurs critères phénotypiques permettant de distinguer les souches de *Streptomyces scabies* des autres microorganismes avec lesquelles elles sont souvent confondues. On retrouve notamment les caractéristiques morphologiques des spores qui sont grises, lisses et cylindriques ( 0,5 µm de large sur 1 µm de long), mais également des caractéristiques physiologiques comme l'utilisation de sucres (L-arabinose, D-fructose, D-glucose, D-mannitol, raffinose, rhamnose, sucrose, D-xylose,...) ou encore la production de pigments mélanoides sur milieu gélosé contenant de la tyrosine (D H Lambert & Loria 1989). Lors de ces travaux, les auteurs ont désigné la souche RL-34 (ATCC 49173) comme étant la souche type de *Streptomyces scabies* (D H Lambert & Loria 1989). Cependant, la majorité des études menées ces dernières décennies ont été réalisées sur une autre souche de *S. scabies* particulièrement virulente, la souche 87-22. Cette dernière fut isolée par le professeur Rosemary Loria à partir d'une lésion d'un tubercule de pomme de terre (Variété Russet Burbank) issu d'une culture agricole dans l'état du Wisconsin aux Etats-Unis (Loria et al. 1995). La souche 87-22 est donc devenue la souche de référence pour l'étude de la pathogénicité chez l'espèce *S. scabies* et est par conséquent la première souche de *Streptomyces* phytopathogène dont le génome a été séquencé par l'institut Sanger (Dawn R D Bignell et al. 2010).

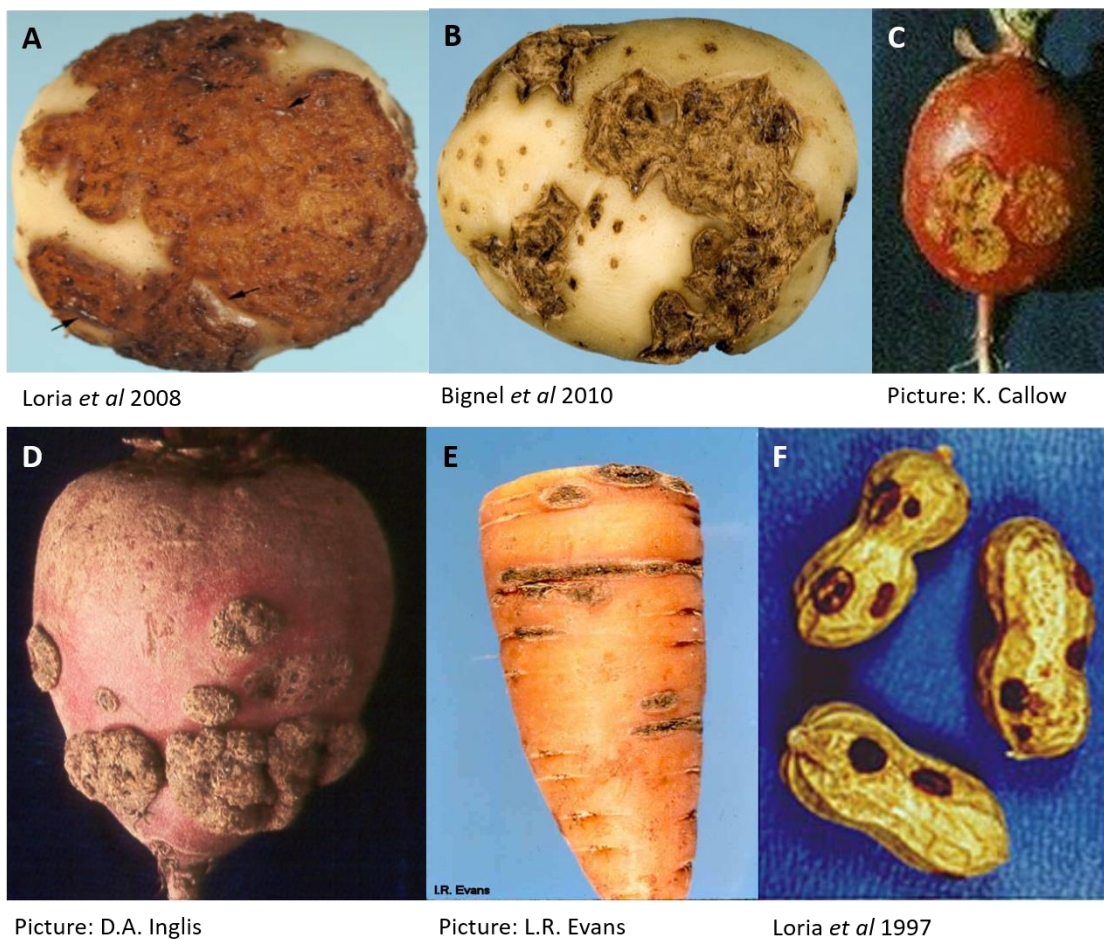
### **2.3.1 Caractéristiques génétiques**

Avec ses 10 148 695 paires de bases, le génome de *S. scabies* 87-22 constitue un des plus grands génomes bactériens séquencés à ce jour. Il est constitué d'un chromosome linéaire riche en G-C (71,45 %) et ne présente aucun ADN extrachromosomique (Yaxley 2009). L'analyse du génome a prédit qu'il contiendrait 8691 gènes dont 8440 coderaient pour des protéines, 18 pour des ARNr, 75 pour des ARNt et les autres pour des pseudogènes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Environ 10 % des protéines codées par ce génome sont prédites comme étant des facteurs de transcription



**Figure 21 : Roland Thaxter (1858-1932)**

Roland Thaxter était un mycologue américain professeur de biologie et de botanique à l'université d'Harvard et renommé pour ses travaux sur les champignons de l'ordre des Laboulbéniales. En 1890, il fut le premier à isoler une souche de *Streptomyces scabies* d'une lésion galeuse d'un tubercule de pomme de terre.



Loria et al 2008

Bignel et al 2010

Picture: K. Callow

Picture: D.A. Inglis

Picture: L.R. Evans

Loria et al 1997

**Figure 22: Symptômes associés à l'infection par *Streptomyces scabies*.**

Lésions caractéristiques de la gale commune causée par *S. scabies* sur des tubercules de pommes de terre (A et B), un radis (C), une betterave (D) et une carotte (E). En Afrique du Sud, *S. scabies* a également été identifié comme étant responsable d'une affection touchant le péricarpe des cacahuètes (F). Quel que soit l'hôte, ces lésions sont généralement localisées à la surface de l'organe infecté. Toutefois, certaines souches de *S. scabies* sont capables de provoquer des lésions plus profondes sur certaines variétés de pommes de terre (B). Les flèches noires sur l'image A indiquent les régions où *S. scabies* commence à sporuler.

dont notamment 69 facteurs sigma (Romero-Rodríguez et al. 2015). Cette abondance de facteurs de transcription reflète indirectement le potentiel d'adaptation de *S. scabies* à son environnement, mais également la complexité des systèmes de régulation qui y sont associés. S'ajoute à cela la régulation post-transcriptionnelle par *bldA* (voir point 1.2.1.1.1). En effet, 248 codons TTA reconnus par l'ARNt<sup>Leu</sup> UUA sont présents dans différentes séquences codantes du génome dont notamment dans les gènes des clusters de biosynthèses des facteurs de virulence de *S. scabies* (voir point 2.6) (Yaxley 2009). Le séquençage du génome de *S. scabies* a également permis d'identifier 28 clusters de gènes potentiellement responsables de la synthèse de métabolites secondaires parmi lesquels 14 ne présentent aucune homologie avec les séquences des banques de données et sont donc susceptibles d'être responsables de la synthèse de nouveaux métabolites secondaires (Yaxley 2009).

La taille importante et le contenu du génome de *S. scabies* sont en faveur de l'idée que ce microorganisme n'est pas un pathogène obligatoire. En effet, les génomes de ces derniers ont généralement subi une délétion de la majorité des gènes nécessaires au mode de vie saprophyte (Bentley & Parkhill 2004).

### 2.3.2 La gale commune

La gale commune de la pomme de terre est l'affection causée par *S. scabies* la plus populaire et la plus étudiée. Pourtant cette bactérie n'est ni spécifique d'un hôte ni spécifique d'un tissu végétal en particulier (Hooker 1949; Loria et al. 2006). Elle reste néanmoins une bactérie du sol qui infectera en conséquence les organes végétaux souterrains avec une préférence pour les organes de réserve. En effet elle est capable d'engendrer les symptômes de la gale commune chez d'autres végétaux tels que les carottes, les betteraves, les radis ou encore les navets (Figure 22) (Goyer & Beaulieu 1997). Elle a également été identifiée comme étant responsable d'une affection visant le péricarpe des cacahuètes (Figure 22F) (Kritzman et al. 1996). Le fait que la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) soit souvent considérée comme l'hôte favoris de *S. scabies* vient du fait que ce tubercule fait l'objet d'une exploitation importante dans le monde agricole<sup>4</sup> et donc que les surfaces dédiées à sa culture sont bien plus importantes que pour les autres hôtes potentiels de ce phytopathogène. Les symptômes de la gale commune se caractérisent par des lésions brunâtres d'aspect rugueux plus ou moins étendues à la surface des tissus infectés (Figure 22). Ces lésions peuvent s'étendre en profondeur, mais restent généralement restreintes à la périphérie des organes ciblés. Ces lésions affectent principalement

---

<sup>4</sup> La pomme de terre est la denrée alimentaire non céréalière la plus cultivée au monde. La production mondiale était de 271 millions de tonnes en 1994 et de 385 millions de tonnes en 2014 (source : FAOSTAT consultée le 28/07/16)

l'aspect, parfois le rendement<sup>5</sup>, mais en aucun cas la qualité nutritionnelle de ces organes (Loria et al. 1997; Hiltunen et al. 2005). En dépit de cette dernière caractéristique, la gale commune engendre des pertes économiques importantes dans certaines régions du monde. Ces pertes sont principalement inhérentes à l'aspect disgracieux des organes infectés ce qui diminue par conséquent leur valeur marchande. Au Canada en 2002, les pertes liées à la gale commune de la pomme de terre ont été estimées entre 15 et 17 millions de dollars canadiens (Hill & Lazarovits 2005). En Tasmanie (Australie), ces pertes ont également été évaluées à plusieurs millions de dollars australiens (Dees & Wanner 2012a).

Outre la gale commune, *S. scabies* est également capable d'engendrer des retards de croissance, des hypertrophies cellulaires ainsi que des nécroses tissulaires chez des plantules de monocotylédones et de dicotylédones avec lesquelles il est mis en culture (Figure 23) (Leiner et al. 1996). Cependant ces observations ont été réalisées en laboratoire sous certaines conditions et les impacts de ce type d'affection dans l'agriculture sont toujours inconnus (Loria et al. 2006).

Cette habilité qu'a *S. scabies* d'infecter une vaste gamme d'hôtes est liée aux caractéristiques des principaux facteurs de virulence que cette bactérie sécrète. En effet, les cibles de ces derniers sont des constituants de la paroi pectocellulosique bien conservés parmi les végétaux (voir point 2.7).

## 2.4 Les autres *Streptomyces* phytopathogènes

Actuellement on recense plus de 900 espèces appartenant au genre *Streptomyces*, parmi lesquelles seule une vingtaine ont été décrites comme étant phytopathogènes (D R D Bignell et al. 2014). *S. scabies* est la première de ces espèces à avoir été identifiée en tant qu'agent responsable de la gale commune. Elle est actuellement la plus caractérisée et est considérée comme la plus répandue à travers le monde. Cependant, durant les deux dernières décennies, d'autres espèces de *Streptomyces* phytopathogènes ont été isolées et également identifiées comme étant responsables de la gale commune ou d'une variante de cette maladie sur les plantes racinaires et les tubercules de pommes de terre (Figure 24) (Dees & Wanner 2012b; D R D Bignell et al. 2014). Parmi ces maladies on retrouve notamment:

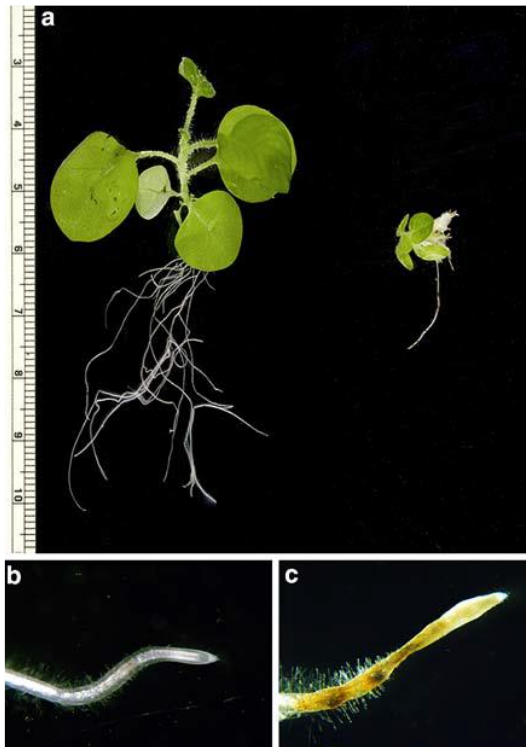
- la **gale « acide »** qui est apparue dans le nord-est des États-Unis et qui présente exactement les mêmes symptômes que la gale commune à la différence qu'elle se manifeste au sein de cultures se développant dans un sol acide<sup>6</sup>. Cette maladie est causée par *Streptomyces acidiscabies* (Lambert and Loria, 1989a).

---

<sup>5</sup> Les tubercules de certaines variétés de pommes de terre touchées par la gale commune peuvent subir un retard de croissance ce qui entraînera une diminution du rendement de la culture (Hiltunen et al. 2005).

<sup>6</sup> Les *Streptomyces* responsables de la gale commune ne se développent pas dans les sols où le pH est inférieur à 5,2 (Loria et al. 2006).





**Figure 23: Effets de l'infection d'un plant de tabac par *S. scabies*.**

a. Le plant de tabac (*Nicotiana glauca*) inoculé avec *S. scabies* 87-22 (droite) présente un ralentissement de croissance de la tige et de la racine par rapport au plant contrôle non inoculé avec la bactérie (gauche). Une vue rapprochée d'une extrémité racinaire du plant de tabac infecté par *S. scabies* 87-22 présente un gonflement et une nécrose (c) par rapport à une racine saine du plant contrôle (b) (Loria et al. 2008).

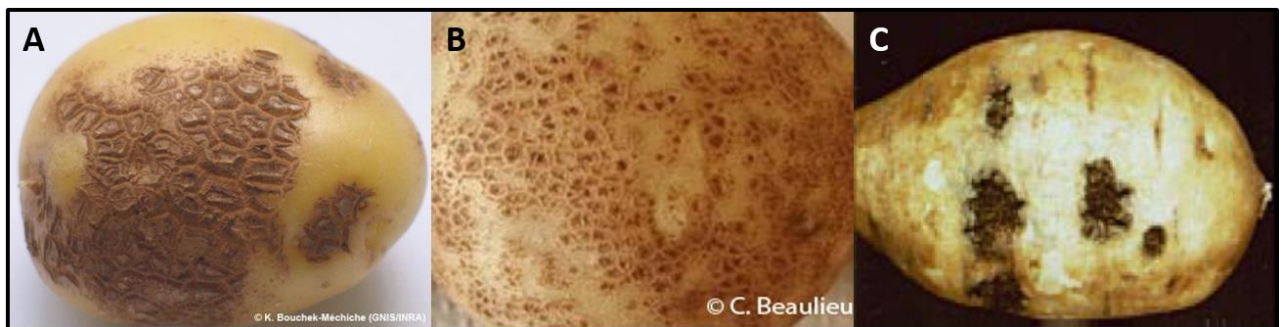


Photo: K. Bouček-Méchiche

Photo: C. Beaulieu

Loria et al 1997

**Figure 24: Symptômes associés aux infections causées par différents *Streptomyces* phytopathogènes.**

Lésions caractéristiques de la gale réticulée (A) et de la gale rousse (B) sur des tubercules de pomme de terre. Symptôme de la pourriture de la patate douce provoquée par *S. ipomoeae* (C).

- La **gale « réticulée »** principalement recensée en Europe se caractérise par des lésions superficielles qui se présentent sous forme d'un réseau brunâtre à la surface de l'organe infecté. La gale réticulée se différencie cependant des autres gales par sa capacité à engendrer de graves nécroses au niveau de toutes les parties souterraines de la plante (tige, stolons et racines) et génère ainsi de grosses pertes de rendement dans les cultures où elle sévit. Aussi, elle se développe plus sévèrement dans les sols froids et humides (Loria et al. 1997). Les principaux agents responsables de la gale réticulée sont ***Streptomyces europaescabiei*** et ***Streptomyces reticuliscabiei*** (Bouчек-Mechiche et al. 2000; Loria et al. 2006).

- La **gale « rousse »** ou rousselure ou encore gale superficielle dont les lésions sont très similaires à celles causées par la gale réticulée, mais ne présente cependant pas le réseau caractéristique de cette dernière. Aussi, la gale rousse ne semble pas induire de nécrose au niveau des racines. Elle se développe dans les sols humides et tempérés (Loria et al. 1997). Les *Streptomyces* identifiés comme responsables de cette maladie sont : ***Streptomyces aureofaciens***, ***S. reticuliscabiei*** et ***Streptomyces cheloniumii*** (Faucher et al. 1993; Bouчек-Mechiche et al. 2000; Natsume et al. 2005).

- La « **pourriture molle de la patate douce** » se caractérise par une nécrose importante des racines et des tubercules de la patate douce (*Ipomoea batatas*) ce qui génère de fortes pertes de rendement de ces cultures. Cette maladie causée par ***Streptomyces ipomoeae*** se développe d'avantage dans les sols secs aux pH supérieurs à 5,2 (Loria et al. 1997). Il est intéressant de noter qu'en plus de la patate douce *S. ipomoeae* est capable d'infecter d'autres membres de la famille des *Convolvulaceae*, mais ne semble cependant pas capable d'infecter naturellement les pommes de terre (famille des *Solanaceae*) (Clark 1983).

- Il existe une dernière affection peu connue découverte au Japon et retrouvée au Costa Rica qui entraîne la formation de tumeur au niveau des racines des cucurbitacées. Elle est engendrée par un *Streptomyces* phytopathogène encore non identifié et dont le mécanisme de pathogénicité n'est pas connu (Loria et al. 1997).

Malgré l'émergence des maladies que nous venons de décrire, la gale commune et plus précisément la gale commune de la pomme de terre reste la maladie la plus répandue et la plus problématique causée par le genre *Streptomyces* à travers le monde.

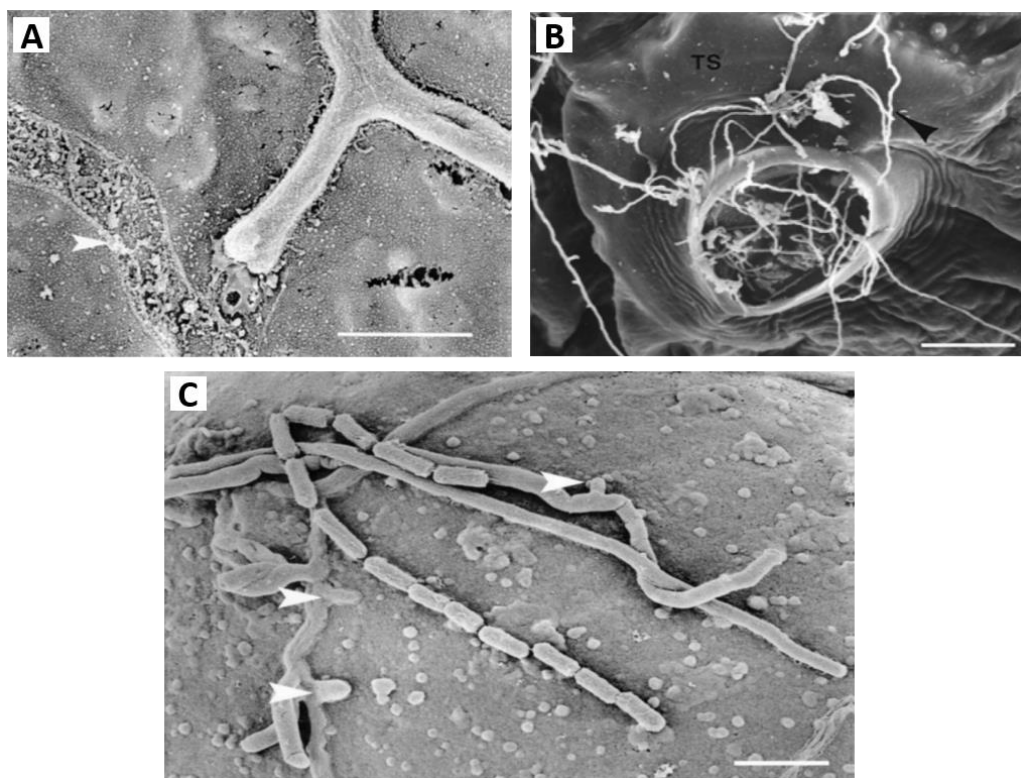
Outre *S. scabies*, d'autres espèces ont été identifiées comme étant responsables de cette maladie (Table 2). Parmi ces dernières, *S. acidiscabiei* et *S. turgidiscabiei* ont retenu l'attention de par leur émergence relativement récente et leur vaste distribution sur les différents continents du globe par rapport aux autres espèces de *Streptomyces* phytopathogènes (Dees & Wanner 2012b). C'est

pourquoi, bien que *S. scabies* soit l'organisme modèle et reste la principale espèce responsable de la gale commune, ces deux espèces sont également utilisées comme modèles notamment concernant l'origine génétique de la pathogénicité chez les *Streptomyces*. En effet, la quasi-totalité des espèces responsables de la gale commune partage des traits génétiques communs leur conférant leur pouvoir pathogène. On retrouve notamment les gènes *nec1* et *tomA* codant pour des protéines de virulence ainsi que les gènes de biosynthèse de la thaxtomine qui est le principal facteur de virulence des *Streptomyces* responsables de la gale commune (voir point 2.6). Ce patrimoine génétique est localisé au niveau d'un îlot de pathogénicité (PAI) qui sera décrit en détail au point 2.7 de cette introduction.

Espèces	Maladie engendrée	Localisation
<i>S. scabies</i>	Gale commune et verrue de la cacahuète	Finlande, Japon, Corée, Amérique du Nord, Afrique du Sud
<i>S. turgidiscabies</i>	Gale commune	Chine, Finlande, Japon, Corée, Amérique du Nord, Norvège, Suède, Royaume-Uni
<i>S. acidiscabies</i>	Gale commune (sol acide)	Chine, Japon, Corée, Amérique du Nord, Royaume-Uni
<i>S. europaeiscabies</i>	Gale réticulée et Gale commune	France, Corée, Amérique du Nord, Norvège, Europe de l'Ouest
<i>S. reticuliscabies</i>	Gale réticulée	France
<i>S. stelliscabies</i>	Gale commune	France, Amérique du Nord
<i>S. luridiscabies</i>	Gale commune	Corée
<i>S. niveiscabies</i>	Gale commune	Corée
<i>S. puniscabies</i>	Gale commune	Corée
<i>S. spp. IdahoX</i>	Gale commune	Amérique du Nord
<i>S. spp. DS3024</i>	Gale commune	Amérique du Nord
<i>S. spp. GK 18</i>	Gale commune	Iran
<i>S. cheloniumii</i>	Gale rousse	Japon
<i>S. spp. MAFF225003</i>	Gale rousse	Japon
<i>S. spp. MAFF225003</i>	Gale rousse	Japon
<i>S. spp. MAFF225003</i>	Gale rousse	Japon
<i>S. spp. MAFF225003</i>	Gale rousse	Japon
<i>S. ipomoeae</i>	Pourriture de la patate douce	Amérique du Nord

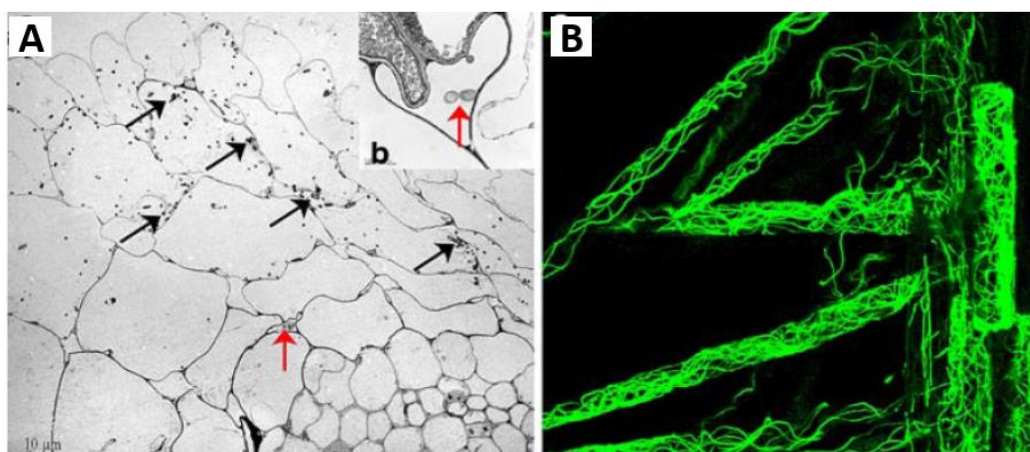
**Table 2 : Liste des espèces de *Streptomyces* phytopathogènes, maladies engendrées et localisation.**

Tableau adapté de Dees et Wanner 2012 et Bignell 2014



**Figure 25: Illustrations des premières étapes de la colonisation d'un tubercule de pomme de terre par *S. scabies*.**

Images de microscopie électronique à balayage d'hyphes de *S. scabies* à la surface d'un tubercule de pomme de terre. A. la flèche blanche indique la présence d'une matrice à l'emplacement où était situé un hyphe bactérien. B. Lenticelle immature colonisée par des hyphes de *S. scabies*. C. La bactérie pénètre l'épiderme du tubercule par l'intermédiaire de petites excroissances perpendiculaires à l'hyphe (flèches blanches) (Loria et al. 2003; Loria et al. 1997).



**Figure 26: Les *Streptomyces* phytopathogènes évoluent intra et intercellulairement**

A. Image de microscopie électronique à transmission d'une coupe de racine de radis infectée par *S. turgidiscabies* Car8. Les flèches noires indiquent la présence de bactéries intracellulaires tandis que les flèches rouges indiquent la présence du pathogène dans les espaces intercellulaires ; un agrandissement d'une partie de la coupe est présenté dans le cadre b. B. Visualisation en microscopie confocale à fluorescence de la colonisation de poils racinaires d'une racine de radis par une souche de *S. turgidiscabies* Car8 exprimant la GFP (Loria et al. 2008).

## 2.5 Les différentes étapes de la colonisation de l'hôte par *Streptomyces scabies*

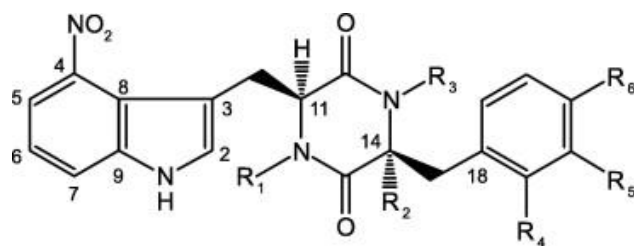
La colonisation de l'hôte est une étape cruciale dans l'initiation de l'infection par un pathogène. Nous décrivons ici les différentes étapes menant à l'infection d'un hôte par *S. scabies* à savoir : i) la rencontre hôte-bactérie, ii) l'attachement à la surface de l'hôte et enfin iii) la pénétration de la bactérie dans le tissu hôte.

i) La rencontre entre un pathogène et son hôte nécessite un déplacement d'un des deux protagonistes. Cependant les végétaux tout comme les *Streptomyces* sont des organismes non mobiles. En effet comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses se développant sous forme de réseaux d'hyphes. Cependant ces bactéries ont la capacité de se différencier pour former des spores qui seront disséminées dans l'environnement. En effet, ces dernières peuvent notamment circuler d'un endroit à un autre en empruntant les microcanaux naturels présents dans les couches superficielles des sols. Cette aptitude a pour effet d'accroître les chances de *S. scabies* de rencontrer un de ses hôtes.

ii) L'attachement de *S. scabies* à la surface d'un tubercule de pomme de terre a été observé en microscopie électronique à balayage (Figure 25). La Figure 25 A indique la présence d'une matrice à l'interface entre la bactérie et la surface de l'organe infecté (Loria et al. 2003). La nature de cette matrice n'a pas été étudiée chez *S. scabies*. Toutefois une étude récente a démontré que les *Streptomyces* sont effectivement capables de sécréter toute une série de polymères (protéines et polysaccharides) leur permettant notamment de s'attacher à différents supports (Petrus & Claessen 2014).

iii) Il a longtemps été reporté que la pénétration de *S. scabies* au sein de son hôte s'opérait uniquement au niveau de régions où l'épiderme de l'organe végétal est fracturé. Ces fractures de l'épiderme sont soit le résultat d'une blessure, soit naturelles comme c'est le cas des lenticelles (Figure 25 B)(Loria et al. 1997). Cependant, il a été suggéré que *S. scabies* est capable de pénétrer directement les cellules de l'épiderme par l'intermédiaire de petites excroissances émergeant perpendiculairement aux hyphes végétatifs (Figure 25 C) (Loria et al. 2003; Dees & Wanner 2012a). Cette capacité à pénétrer directement les cellules de l'épiderme est une caractéristique extrêmement rare chez les bactéries phytopathogènes. L'agent pathogène se développe ensuite intra et intercellulairement au sein de l'organe infecté (Figure 26) (Loria et al. 2008).

Quel que soit le site de pénétration, la condition *sine qua non* au succès de celle-ci est qu'elle ait lieu au niveau d'un tissu en croissance. Par exemple, *S. scabies* est incapable de coloniser un tubercule une fois celui-ci arrivé à maturité. En effet, les tubercules de plus de six semaines sont généralement beaucoup moins susceptibles à une infection par *Streptomyces scabies*. C'est pourquoi



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
1	Me	OH	Me	H	OH	H
2	Me	OH	Me	OH	H	H
3	Me	H	H	H	H	H
4	Me	OH	Me	H	H	H
5	Me	H	Me	H	H	H
6	Me	OH	H	H	H	H
7	Me	OH	Me	H	H	OH
8	Me	OH	Me	H	OH	OH
9	Me	OH	H	H	OH	H
10	H	OH	Me	H	OH	H
11	H	H	H	H	H	H

(Russell R. King & Calhoun 2009)

#### Figure 27 : Liste des différents membres de la famille des thaxtomines

Ces 11 différentes thaxtomines isolées et caractérisées à ce jour se différencient les unes des autres en fonction des groupements retrouvés au niveau de six sites de substitution (R<sub>1</sub> à R<sub>6</sub>). En effet, les sites R<sub>1</sub> et R<sub>3</sub> peuvent être méthylés (Me) tandis que les sites R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> peuvent être hydroxylés (-OH). Le composé 1 est la thaxtomine A, la principale thaxtomine produite par les *Streptomyces* responsables de la gale commune. Le composé 3 est la thaxtomine C la principale thaxtomine produite par *S. ipomoeae* responsable de la pourriture molle de la patate douce. Le composé 11 est la seule thaxtomine qui n'est pas synthétisée par *S. scabies*.

une fois stockés les tubercules ne sont plus sensibles à la gale commune (Dees & Wanner 2012a). Cette condition est directement inhérente aux activités biologiques du principal facteur de virulence de *S. scabies*: la thaxtomine (voir point 2.6.1.4).

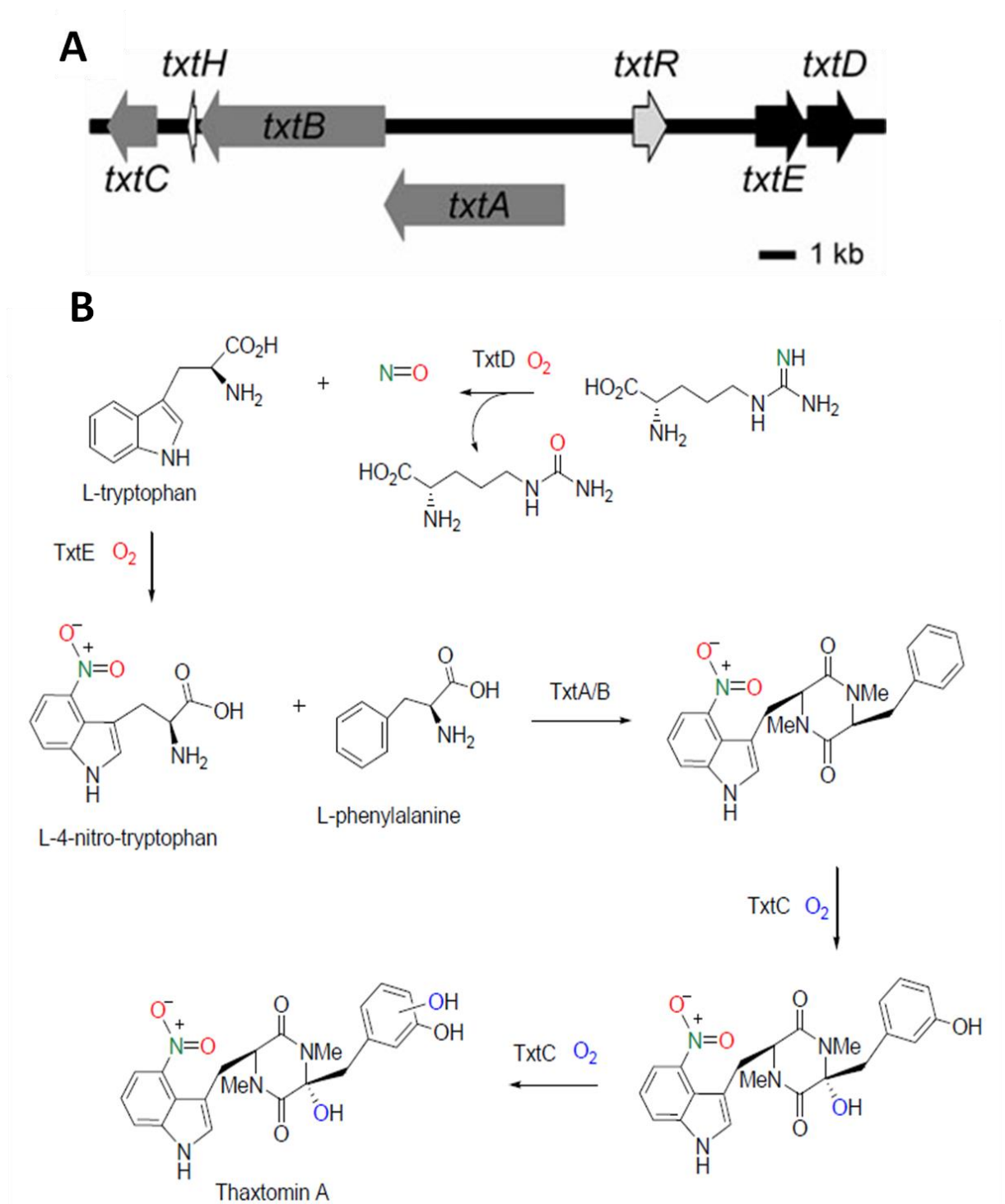
## **2.6 Les facteurs de virulence de *Streptomyces scabies***

Hurley Fellows fut le premier à suggérer que l'organisme responsable de la gale commune devait sécréter un facteur diffusible tel qu'une enzyme et/ou une toxine lui permettant de coloniser son hôte (Fellows 1926). Cette hypothèse fut renforcée par les observations menées par Jones sur des lésions galleuses d'un tubercule de pomme de terre. Ce dernier observa qu'un brunissement des tissus avait lieu à l'endroit colonisé par le microorganisme, mais également au niveau des tissus sous-jacents encore non colonisés (Jones 1931). Ce concept fut démontré par la constatation qu'un extrait issu d'une lésion galeuse d'un tubercule de pomme de terre est capable d'induire, après stérilisation, ce même type de lésion sur un tubercule sain en croissance (Lawrence & Barker 1963).

C'est finalement en 1989 que le premier facteur de virulence associé à la gale commune a été isolé et caractérisé (King et al. 1989). Il s'agit d'une phytotoxine nommée « thaxtomine » en l'honneur de Roland Thaxter, le premier phytopathologiste à avoir identifié l'organisme responsable de la gale commune (Thaxter 1890). Depuis la découverte de la thaxtomine, plusieurs facteurs de virulence potentiels ont été identifiés chez *S. scabies*. Nous décrivons ici l'ensemble de ces facteurs de virulence en apportant cependant un complément d'information concernant la synthèse, l'induction et le mode d'action de la thaxtomine. En effet, plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la phytopathogénicité des *Streptomyces* responsables de la gale commune et leur capacité à produire cette phytotoxine (King et al. 1991; Goyer et al. 1998; Kinkel et al. 1998; Healy et al. 2000). Actuellement, la thaxtomine constitue le seul facteur de virulence avéré de *S. scabies* et de la majorité des *Streptomyces* phytopathogènes (D R D Bignell et al. 2014).

### **2.6.1 Les thaxtomines**

Les thaxtomines sont des dipeptides cycliques (2,5-diketopiperazines) résultants de la condensation d'un L-4-nitrotryptophane et d'une L-phénylalanine. La nitration du tryptophane en position 4 ainsi que la configuration L des deux acides aminés sont essentielles à la phytotoxicité des thaxtomines. À ce jour, onze membres de cette famille de phytotoxines ont été isolés et caractérisés. Ils diffèrent uniquement par la présence ou l'absence de groupement hydroxyle ou méthyle au niveau de leurs sites de substitution respectifs (Figure 27) (Russell R. King & Calhoun 2009). La thaxtomine A (composé 1 Figure 27) est la thaxtomine majoritairement produite par *S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* tandis que *S. ipomoeae* produit principalement la thaxtomine C (composé 3 Figure 27) (D R D Bignell et al. 2014; Russell R. King & Calhoun 2009).



**Figure 28: Biosynthèse de la thaxtomine A**

A. Organisation génétique des gènes de biosynthèse de thaxtomine. B. Schéma de biosynthèse de la thaxtomine A (Adapté de Barry et al., 2012).



### 2.6.1.1 Biosynthèse de la thaxtomine A

La voie de biosynthèse de la thaxtomine A a récemment été complétée en 2012 (Figure 28)(Barry et al. 2012). Celle-ci débute par la nitration du noyau indole du L-tryptophane. Cette réaction est catalysée par la cytochrome P450 monooxygénase, TxtE, à partir de monoxyde d'azote (NO) et d'oxygène (Barry et al. 2012). Le NO nécessaire à cette réaction est produit par la NO synthétase TxtD/Nos à partir de l'arginine (Kers et al. 2004). La prochaine étape permettant la cyclisation du L-4-nitrotryptophane avec la L-phénylalanine fait intervenir deux NRPS : TxtA et TxtB (Healy et al. 2000). Le L-4-nitrotryptophane est le substrat de TxtB tandis que la L-phénylalanine est le substrat de TxtA (Johnson et al. 2009). Il en résulte un dipeptide cyclique méthylé appelé thaxtomine D. Il semble que la méthylation des deux acides aminés soit catalysée par les domaines N-méthyltransférases des deux NRPS et qu'elle a lieu avant la réaction de cyclisation (D R D Bignell et al. 2014). La dernière étape de la synthèse de la thaxtomine A est l'hydroxylation du résidu phénylalaninyl par une nouvelle cytochrome P450 monooxygénase, TxtC (Healy et al. 2002). L'absence du gène codant pour TxtC dans le génome de *S. ipomoeae* explique pourquoi cette espèce est incapable de produire la thaxtomine A (Dawn R. D. Bignell et al. 2010; Guan et al. 2012).

Chez *Streptomyces scabies*, l'ensemble des gènes nécessaires à la biosynthèse de la thaxtomine est regroupé sous forme d'un cluster localisé au sein de la région toxicogénique (TR) de l'îlot de pathogénicité (voir point 2.7). Ces gènes sont organisés en deux opérons, le premier consisterait en *txtA*, *txtB*, *txtH*, et *txtC* et le second consiste en *txtD/nos* et *txtE*. Le gène *txtH* coderait pour une petite protéine appartenant à la famille MbtH-like<sup>7</sup> dont les membres souvent associés aux NRPS faciliteraient la réaction d'adénylation de l'acide aminé par le domaine A du NRPS. Enfin, le gène *txtR* code pour l'activateur transcriptionnel nécessaire à l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine (voir point 2.6.1.2) (D R D Bignell et al. 2014).

### 2.6.1.2 Régulation génétique de la synthèse de thaxtomine chez *S. scabies*

La production de thaxtomine chez *S. scabies* est un événement hautement régulé faisant intervenir différents niveaux de contrôle. En effet, comme c'est le cas pour la plupart des métabolites secondaires, l'expression des gènes de biosynthèse de la thaxtomine est sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel spécifique qu'est TxtR, mais également sous le contrôle de régulateurs globaux codés par des gènes *bld*.

---

<sup>7</sup> Le nom de cette famille de protéine vient du nom de la protéine MbtH identifiée dans la voie de biosynthèse de la mycobactine chez *Mycobacterium tuberculosis* (Quadri et al. 1998).

## Le régulateur spécifique TxtR

TxtR est un régulateur appartenant à la famille AraC/XylS. Les régulateurs de cette famille sont généralement des activateurs transcriptionnels et sont habituellement impliqués dans le métabolisme du carbone, la réponse au stress ainsi que dans la pathogénicité. Ces activateurs possèdent dans leur région C-terminale deux motifs de liaison à l'ADN de type HTH (helix-turn-helix). Le domaine de liaison à un ligand spécifique est quant à lui situé du côté N-terminal du régulateur. Les éléments *cis* liés par ces régulateurs sont souvent multiples au sein d'un même promoteur et sont généralement proches de la boîte -35 (Gallegos et al. 1997; Romero-Rodríguez et al. 2015).

Le gène codant pour le régulateur TxtR est présent au sein des gènes de biosynthèse de thaxtomine (Figure 28A) et est extrêmement bien conservé chez les principales espèces de *Streptomyces* phytopathogènes que sont *S. scabies*, *S. turgidiscabies* et *S. acidiscabies* (M. V. Joshi et al. 2007). Cet activateur transcriptionnel est indispensable à l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine. En effet, chez *S. scabies* la délétion de *txtR* entraîne une diminution drastique de l'expression des gènes *txtABC* et dans une moindre mesure de *txtD/nos* et mène par conséquent à une incapacité de ce mutant à produire la phytotoxine (M. V. Joshi et al. 2007).

Les mécanismes par lesquels TxtR active la transcription des gènes de biosynthèse de thaxtomine (gènes *txt*) n'ont pas encore été élucidés. Cependant, certains auteurs suggèrent que TxtR agirait en tant qu'antirépresseur. En effet, l'hypothèse est que les gènes *txt* sont maintenus silencieux par la présence de protéines inhibitrices liées à l'ADN au niveau du promoteur. Le rôle de TxtR serait de déplacer ces protéines inhibitrices ce qui permettrait la transcription des gènes maintenus silencieux jusqu'alors (Yang et al. 2011). Ce mécanisme d'antirépression implique donc une compétition entre TxtR et les protéines inhibitrices pour une même séquence d'ADN. L'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine serait donc dépendante de l'abondance relative ainsi que de l'affinité respective de ces protagonistes envers le promoteur. Les auteurs précisent également qu'une fois lié à son effecteur allostérique le régulateur verrait son affinité envers ses éléments *cis* modifiée (Yang et al. 2011).

Cette hypothèse concorde avec les observations selon lesquelles la présence de cellobiose induit une surproduction de thaxtomine chez *S. scabies* ainsi que la présence au niveau du domaine N-terminal de TxtR d'un site de liaison pour le cellobiose (M. V. Joshi et al. 2007). En effet, une fois lié au cellobiose TxtR verrait son affinité envers ses éléments *cis* nettement augmenter ce qui induirait la transcription des gènes *txt* et donc la production de thaxtomine.

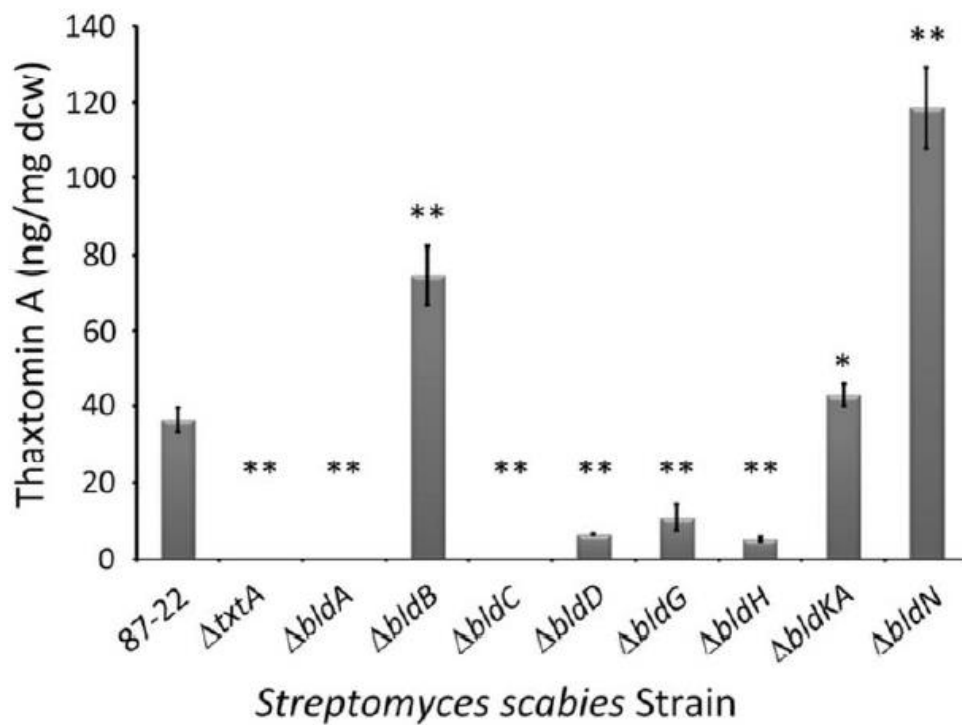
## Les gènes *bld*

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction les gènes *bld* codent pour des régulateurs globaux intervenant dans les processus de différenciation morphologique, mais également dans la production de nombreux métabolites secondaires. Une étude récente a démontré l'implication directe et/ou indirecte d'au moins cinq gènes *bld* dans la production de thaxtomine et la virulence chez *S. scabies*. En effet, la délétion respective de chacun des gènes *bldA*, *bldC*, *bldD*, *bldG* et *bldH/adpA* induit une diminution ou une abolition complète de la production de thaxtomine chez ce phytopathogène (Figure 29). L'ensemble de ces mutants présente une diminution de l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine. À l'exception du mutant  $\Delta bldH$ , tous présentent également une diminution de l'expression du gène codant pour l'activateur transcriptionnel TxtR (Dawn R D Bignell et al. 2014). Cependant, les mécanismes par lesquels ces régulateurs globaux modulent la production de thaxtomine et la virulence chez *S. scabies* ne sont toujours pas clairement élucidés. Seul le mutant dont le gène *bldA* est délété présente néanmoins une explication satisfaisante.

En effet, la diminution de la production de thaxtomine dans le mutant  $\Delta bldA$  est associée à la présence d'un codon TTA en position 203 dans le gène codant pour l'activateur transcriptionnel TxtR (Dawn R D Bignell et al. 2014; M. V. Joshi et al. 2007). L'absence du gène *bldA* - codant pour le seul ARN de transfert capable de traduire le codon leucine rare UUA (voir intro) - entraîne un arrêt de traduction des ARNm codant pour TxtR ce qui a pour conséquence une diminution drastique de la transcription des gènes de biosynthèse de thaxtomine. La régulation post-transcriptionnelle par *bldA* sur la traduction de TxtR et *in fine* sur la production de thaxtomine est donc bien établie. Par contre la diminution de la transcription du gène *txtR* chez ce mutant par rapport à la souche sauvage suggère que l'activateur transcriptionnel TxtR s'autorégulerait et/ou serait régulé par un autre régulateur TTA dépendant.

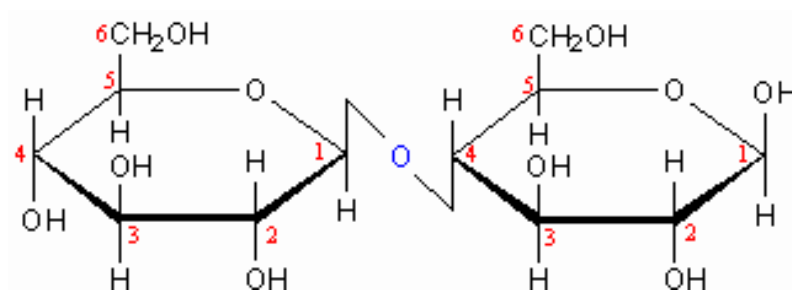
### 2.6.1.3 Les éliciteurs et inhibiteurs de la synthèse de thaxtomine

Le déclenchement de la synthèse d'une phytotoxine chez un phytopathogène ou plus généralement d'un métabolite secondaire chez un microorganisme est généralement associé à la perception d'un (ou plusieurs) signal (signaux) environnemental (environnementaux). La nature de ce signal peut être un stress physico-chimique telle une variation du pH, de l'état redox, de l'osmolarité, de la température ou encore de l'état nutritionnel du milieu environnant. L'information portée par le signal est transmise au sein du cytoplasme de la bactérie par l'intermédiaire de protéines membranaires et ensuite perçue par des protéines cytoplasmiques ce qui permet au microorganisme d'adapter son métabolisme en réponse à ce signal. Ces adaptations physiologiques se traduisent par



**Figure 29: Production de thaxtomine A des différents mutants *bld* de *S. scabies* 87-22**

Les souches ont été incubées 7 jours à 25°C en milieu liquide OBB. La thaxtomine A sécrétée dans le surnageant de culture a été dosée par HPLC. Le mutant *ΔtxtA* est utilisé comme témoin négatif. Lorsque le niveau de production de thaxtomine A d'un mutant est significativement différent de celui du WT il est indiqué \* ( $p < 0,01$ ) ou \*\* ( $p < 0,001$ ). dcw : dry cell weight.



**Figure 30: Structure chimique du cellobiose ou  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose**

l'expression et/ou la répression de plusieurs gènes au niveau du chromosome de la bactérie. Notons également que la perception, l'interprétation et la réponse au signal perçu par la bactérie sont directement dépendants de l'état développemental du microorganisme (Bibb 2005).

Chez *Streptomyces scabies* l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine est dépendante de la présence et de l'absence de différents signaux environnementaux. Dans ce chapitre nous décrirons donc les principaux éliciteurs et inhibiteurs de la synthèse de cette phytotoxine chez *S. scabies*.

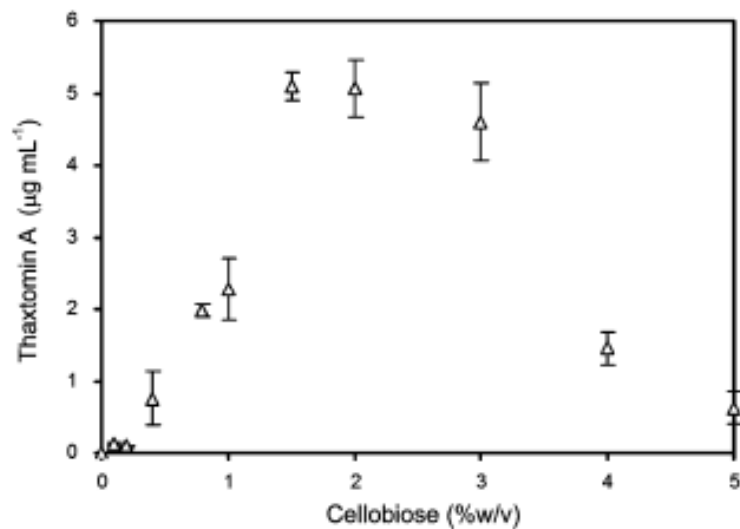
#### **2.6.1.3.1 Les molécules inductrices**

Les preuves de l'existence de molécules spécifiques induisant la production de thaxtamine chez *S. scabies* ont été amenées dès les années 1990. A cette époque, les chercheurs observent que le phytopathogène produit de la thaxtamine uniquement *in vivo* au niveau de tissus infectés ou *in vitro* sous certaines conditions. En effet, seuls les milieux créés à partir d'extraits de végétaux comme le flocon d'avoine, le son d'avoine ou les jeunes tubercules de pommes de terre permettent la production de thaxtamine alors que les milieux de culture classiques comme les ISP, le LB ou le TSB ne le permettent pas (Babcock et al. 1993; Loria et al. 1995). Les études visant à identifier dans ces milieux de culture les molécules induisant la production de thaxtamine se sont alors multipliées. Actuellement, trois molécules d'origine végétale : le cellobiose (et cellotriose), la subérine et le xylane sont décrits comme inducteurs de la synthèse de thaxtamine. Cependant le cellobiose est reconnu comme étant le principal éliciteur spécifique responsable de la synthèse de la phytotoxine chez *S. scabies*.

##### **Le cellobiose**

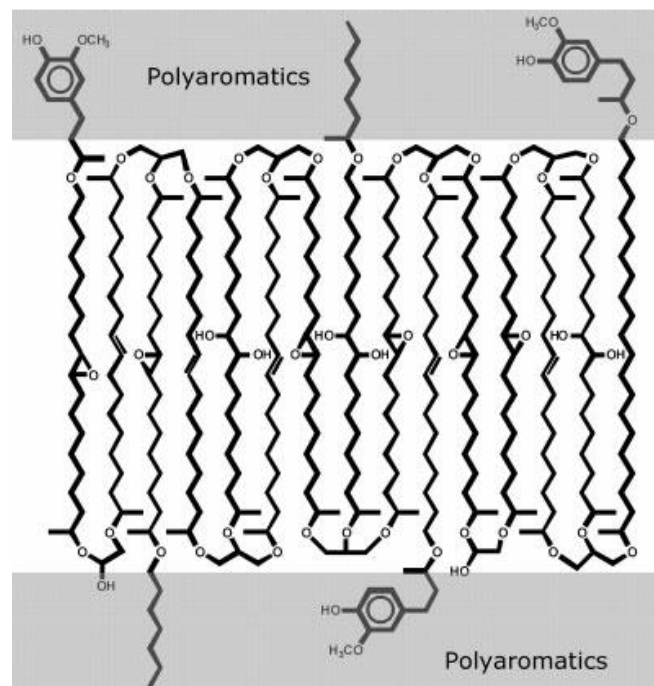
Le cellobiose est le monomère de base de la cellulose, il est constitué de deux molécules de glucoses reliées entre elles par une liaison  $\beta$ 1-4 (Figure 30). La cellulose est la source de carbone la plus abondante sur terre et le principal polysaccharide de la paroi pectocellulosique des cellules végétales (voir point 1.3.1).

Le cellobiose est un signal très efficace dans l'induction de la synthèse de thaxtamine, mais ne constitue pas pour autant une source nutritive de choix pour *S. scabies*. En effet l'utilisation de ce disaccharide comme seule source de carbone dans un milieu de culture ne permet pas une croissance optimale de la bactérie (Wach et al. 2007). De plus, le cellobiose semble induire un retard du développement en repoussant la différenciation morphologique chez *S. scabies*, mais également chez d'autres espèces de *Streptomyces* (Lerat et al. 2010; Lerat et al. 2012). Les études menées sur l'induction par le cellobiose sont donc réalisées en présence d'autres sources de carbone comme le sorbose ou l'amidon qui permettent une bonne croissance de la bactérie sans contrecarrer l'effet inducteur du disaccharide sur la production de thaxtamine.



**Figure 31: Effet de la concentration en cellobiose sur la production de thaxtomine par *S. turgidiscabies* Car8**

Production de thaxtomine par *S. turgidiscabies* Car8 après 7 jours de culture en milieu TDM (Thaxtomine-Defined Media) liquide en présence de différentes concentrations en cellobiose. Les concentrations en cellobiose à partir de 4 g/L stimulent la production de thaxtomine jusqu'à atteindre un maximum de production à 15 g/L (1,5% m/v). Cependant, au-delà de 15 g/L l'effet stimulateur du cellobiose sur la production de thaxtomine diminue.



(Graça & Santos 2007)

**Figure 32: Illustration de la structure chimique de la subérine**

L'effet inducteur du disaccharide est optimal lorsqu'il est présent dans le milieu de culture durant les premières 24 heures après inoculation (Johnson et al. 2007). On observe également une corrélation positive entre l'augmentation de la concentration en cellobiose et la quantité de thaxtamine produite par le phytopathogène. Cependant, cette corrélation s'inverse au-delà d'une concentration de 1,5 % (Figure 31) (Johnson et al. 2007).

Actuellement, le cellobiose est le meilleur inducteur de la synthèse de thaxtamine chez *S. scabiei*. Il agit en tant qu'effecteur allostérique du régulateur transcriptionnel spécifique des gènes de biosynthèse de thaxtamine :TxtR (voir point 2.6.1.2) (M. V. Joshi et al. 2007).

### **La subérine**

La subérine est un biopolymère d'origine végétale extrêmement complexe essentiellement constitué de longues chaînes aliphatiques et de résidus aromatiques (Figure 32). Ce polyester est principalement synthétisé à la périphérie des tiges ou des racines par un tissu spécialisé appelé phellème<sup>8</sup>. Ce dernier joue le rôle de barrière protectrice contre les agressions environnementales et les phytopathogènes, mais joue également un rôle dans la thermo- et l'osmorégulation (Graça & Santos 2007). On retrouve notamment la subérine au niveau du périoderme de la pomme de terre saine, mais également au niveau des structures rugueuses d'aspect brunâtre retrouvées au niveau des lésions caractéristiques de la gale commune. La présence de ce biopolymère au niveau du site d'infection de *S. scabiei* a poussé certains auteurs à étudier son implication dans l'induction de la synthèse de thaxtamine.

Ces derniers ont montré que la subérine seule n'induit que très peu la production de thaxtamine chez *S. scabiei*. Cependant, en présence de cellobiose ce polyester semble agir en synergie avec cet inducteur. En effet, la quantité de thaxtamine produite par *S. scabiei* en milieu contenant à la fois la subérine et le cellobiose est supérieure à la quantité de phytotoxine produite en milieu contenant uniquement le cellobiose (Lerat et al. 2010). Bien que les mécanismes moléculaires responsables de la stimulation de la production de thaxtamine en présence de subérine ne soient toujours pas clairement élucidés, plusieurs hypothèses sont cependant avancées.

La subérine étant un polymère complexe de grande taille il est possible qu'un produit de dégradation de celle-ci soit à l'origine de la stimulation de la biosynthèse de thaxtamine chez *S. scabiei* (Beauséjour et al. 1999). En effet, les analyses protéomiques des extraits de cultures de *S. scabiei* ayant poussé en présence de subérine ont permis d'identifier plusieurs estérases potentiellement capables de dégrader ce polymère (Komeil et al. 2014a). Cependant, parmi les constituants et les précurseurs de la subérine qui ont été testés sur des cultures de *S. scabiei* en milieu contenant du cellobiose, aucun n'a induit une augmentation de production de thaxtamine (Wach et al. 2007).

---

<sup>8</sup> Le phellème est plus connu sous le nom de suber ou liège

On sait également que la subérine induit une accélération du développement chez les *Streptomyces* (Lauzier et al. 2008; Lerat et al. 2012). En effet, l'ajout de subérine dans le milieu de culture induit la formation précoce d'hyphes aériens et stimule la production de métabolites secondaires chez différentes espèces de streptomycètes (Lerat et al. 2012).

Aussi, l'analyse comparative du sécrétome de *S. scabies* cultivé en milieu contenant de la caséine additionné ou non de subérine a montré qu'une grande proportion des protéines surexprimées ou uniquement produites en présence de subérine était entre autres impliquée dans le métabolisme du carbone et plus précisément dans l'utilisation de la cellulose (Komeil et al. 2014b). Ces résultats sont renforcés par d'autres analyses du protéome et du transcriptome de cultures de *S. scabies* réalisées en milieu contenant de la cellulose et/ou de la subérine. Ces analyses ont montré que la présence simultanée de cellulose et de subérine induit une surexpression d'une partie des cellulases de *S. scabies* (Padilla-Reynaud et al. 2015). Les auteurs suggèrent donc que la subérine interviendrait dans l'induction de la production de thaxtamine chez *S. scabies* de deux manières : i) en induisant une surproduction des cellulases qui génèreraient l'apparition du cellobiose activant l'expression des gènes de synthèse de thaxtamine et ii) en stimulant la différenciation morphologique et physiologique et par conséquent la production de métabolite secondaire et donc de la thaxtamine (Padilla-Reynaud et al. 2015; Lauzier et al. 2008; Lerat et al. 2012).

### **Le xylane**

Le xylane est un constituant majeur des hémicelluloses, c'est un polymère de xyloses reliés par des liaisons  $\beta$ 1-4. Les hémicelluloses sont des polysaccharides reliant les fibres de cellulose entre elles, ce qui contribue au renforcement de la paroi pectocellulosique des cellules végétales (voir point 1.3.1) (Scheller & Ulvskov 2010).

L'induction de la production de thaxtamine par le xylane a été observée dans une culture de *S. acidiscabies*. Les auteurs ont également observé que les produits d'hydrolyse du xylane étaient capables d'induire la production de thaxtamine chez cette espèce (Wach et al. 2007). La corrélation positive entre le temps d'hydrolyse du xylane et la quantité de thaxtamine produite par *S. acidiscabies* suggère que les xylooligosaccharides de faibles masses moléculaires pourraient être des éliciteurs de la production de thaxtamine chez cette espèce (Wach et al. 2007). Une seconde étude a cependant montré que ni xylose ni le xylobiose ne sont capables d'induire la production de thaxtamine chez *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* (Johnson et al. 2007). À ce jour l'implication des autres xylooligosaccharides dans l'induction de la phytotoxine n'a toujours pas été investiguée.



#### **2.6.1.3.2 Les molécules inhibitrices**

Plusieurs molécules inhibant la production de thaxtomine chez *S. scabies* ont été mises en évidence. Cependant les mécanismes moléculaires à l'origine de cette inhibition sont probablement très complexes et n'ont toujours pas été élucidés.

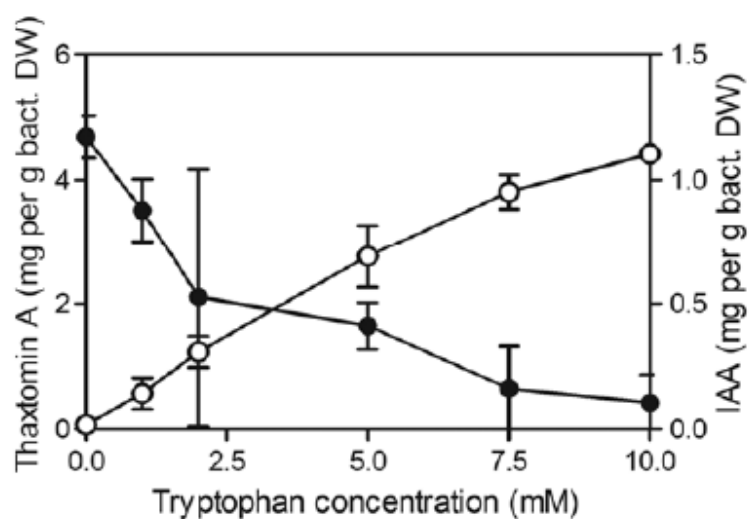
#### **Les sources de carbone**

L'inhibition de la production d'un métabolite secondaire par différentes sources de carbone est un phénomène très courant chez les *Streptomyces*. Ces sources de carbone sont généralement des sucres facilement assimilables et métabolisables par le microorganisme. Parmi ceux-ci, le glucose est le plus fréquemment impliqué dans ces phénomènes de répression, mais d'autres sucres simples comme le xylose, le mannose, le glycérol ou encore le maltose (disaccharide) ont également été reportés comme étant inhibiteur de la synthèse de métabolites secondaires chez les *Streptomyces* (Ruiz et al. 2010).

Chez *S. scabies* la synthèse de thaxtomine est inhibée en présence de glucose (Babcock et al. 1993; Loria et al. 1995; Wach et al. 2007) et de glycérol (communication personnelle). Aussi, il semble que l'inhibition par le glucose soit plus importante en culture liquide qu'en milieu gélosé (Loria et al. 1995). Les mécanismes *via* lesquels le glucose diminue ou inhibe la production de la phytotoxine ne sont toujours pas connus.

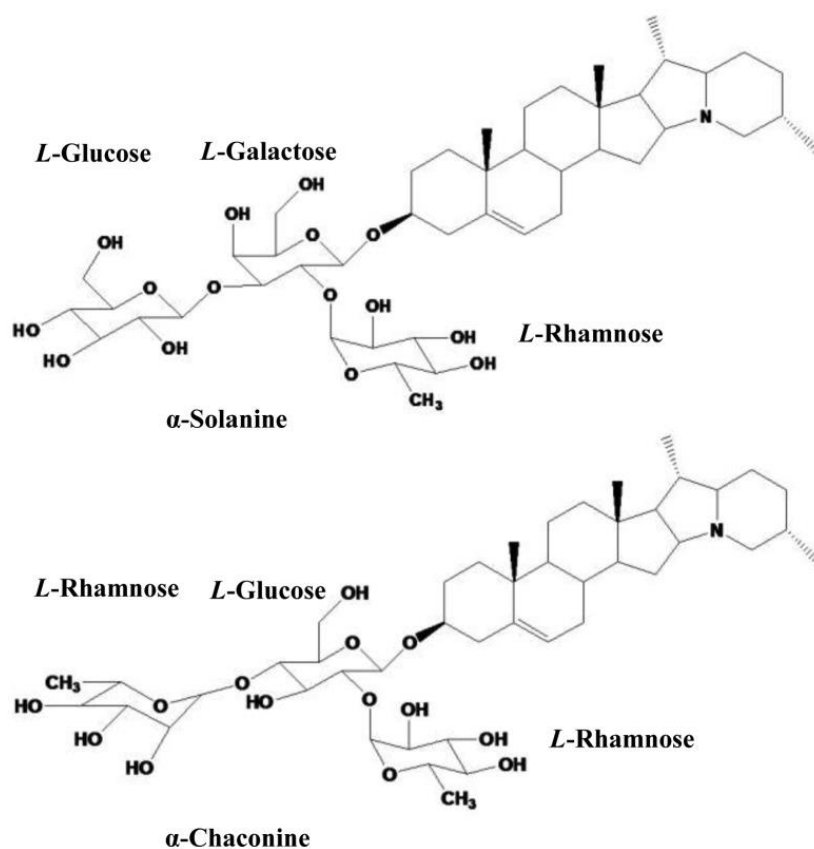
#### **Les acides aminés**

À une concentration de 10 mM, l'ensemble des acides aminés inhibe la production de thaxtomine chez *S. scabies* (Lauzier et al. 2002). Cependant cet effet n'est pas spécifique aux acides aminés. Effectivement, l'excès d'une source d'azote directement assimilable entraîne souvent une réduction ou une inhibition du métabolisme secondaire chez les actinomycètes (Shapiro 1989). À une concentration de 2,5 mM, seuls les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) inhibent la synthèse de thaxtomines chez *S. scabies*. Les acides aminés aliphatiques n'ayant aucun effet à cette concentration, l'excès d'azote ne semble plus être la raison de cette inhibition (Lauzier et al. 2002). Il est surprenant de constater que les deux précurseurs de la thaxtomine, à savoir le tryptophane et la phénylalanine aient un effet inhibiteur sur la synthèse de la phytotoxine (Babcock et al. 1993; Lauzier et al. 2002). C'est pourquoi l'effet du tryptophane sur la physiologie de *S. scabies* a notamment été étudié par le groupe du professeur Carole Beaulieu (Université de Sherbrooke, Ca). Ces derniers ont observé que l'augmentation de la concentration



**Figure 33: Le tryptophane induit un switch entre la synthèse de thaxtomine et d'auxine chez *S. scabies*.**

Production de thaxtomine (•) et d'auxine (IAA) (o) par *S. scabies* EF-35 en milieu SCM (subérine-cellobiose media) contenant différentes concentrations en tryptophane (Legault et al. 2011). L'effet inhibiteur du tryptophane sur la biosynthèse de thaxtomine débute dès 100  $\mu$ M (Iauzie 2002).



**Figure 34 : Structures chimiques de l' $\alpha$ -solanine et de l' $\alpha$ -chaconine.**

(H. Wang et al. 2013)

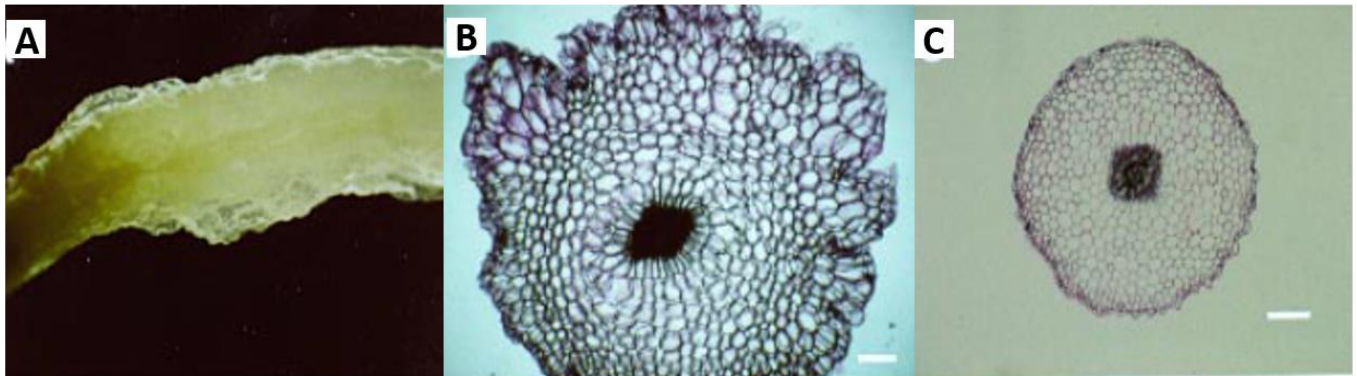
en tryptophane induit d'une part une inhibition de la synthèse de thaxtomine et d'autre part une augmentation de la synthèse d'auxine par *S. scabies* (Figure 33) (Legault et al. 2011). En effet, ce phytopathogène est capable de produire de l'auxine à partir de tryptophane en faisant intervenir notamment deux gènes de biosynthèse de cette hormone, à savoir *iaaM* et *iaaH* (voir point 2.6.4.4). Les auteurs ont montré que l'ajout de tryptophane induit notamment la répression de l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine *nos* et *txtA* mais n'a cependant aucun effet sur l'expression des gènes *iaaM* et *iaaH* (Legault et al. 2011).

### **Les glycoalkaloïdes**

L' $\alpha$ -chaconine et l' $\alpha$ -solanine (Figure 34) sont des glycoalkaloïdes retrouvés chez les plantes de la famille des *Solanaceae*. Ces glycoalkaloïdes inhibent la production de thaxtomine chez *S. acidiscabies* sans pour autant inhiber la croissance du phytopathogène (Wach et al. 2007). Ceci suggère que l' $\alpha$ -chaconine et l' $\alpha$ -solanine pourraient potentiellement cibler un des acteurs moléculaires responsables de la synthèse de thaxtomine. Cependant, cette inhibition est observée à des concentrations (à partir de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) cinq fois supérieures à celles retrouvées dans la pelure des tubercules de pomme de terre (Wach et al. 2007).

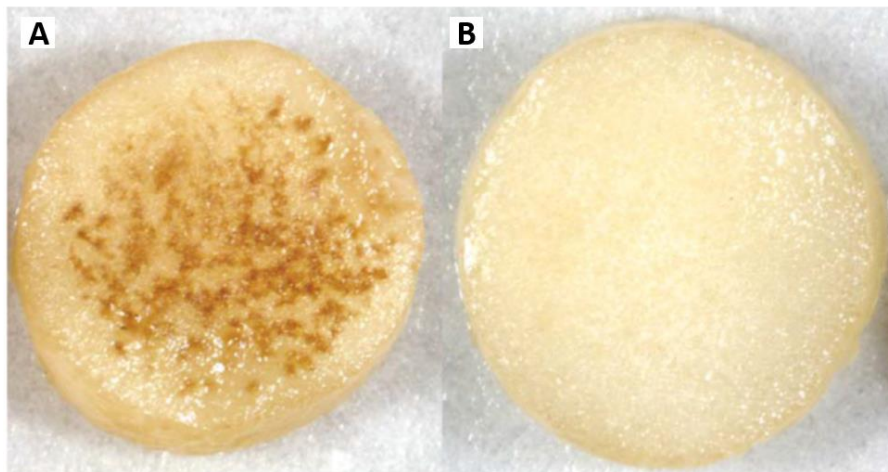
### **La scopoletine**

La scopoletine est une phytoalexine produite par différents végétaux en réponse à différents pathogènes ou éliciteurs. Chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum*, la thaxtomine A induit la production et l'accumulation de scopoletine dans les tissus de la plante. Chez *S. scabies*, cette phytoalexine a pour effet d'altérer la croissance, mais également d'inhiber la synthèse de thaxtomine. Bien que les mécanismes moléculaires impliqués ne soient pas connus, l'inhibition de la synthèse de thaxtomine semble notamment corrélée avec la répression de l'expression du gène *nos* (Lerat, Babana, et al. 2009).



**Figure 35: La thaxtomin A induit une hypertrophie cellulaire**

Gonflement latéral de l'hypocotyle d'une plantule de radis traitée à la thaxtomin A (A). Coupe transversale de l'hypocotyle de radis présenté en A (B). Coupe transversale d'un hypocotyle de radis non traité (C) (Loria et al. 1997). Ces images montrent que le gonflement latéral de l'hypocotyle induit par la thaxtomin A est dû à une hypertrophie des cellules et non à une hyperplasie (Leiner et al. 1996).



**Figure 36: La thaxtomin A induit une nécrose sur des tranches de tubercule de pomme de terre**

La tranche de tubercule de pomme de terre traitée avec une solution de thaxtomin A (45 ng/ml) présente une nécrose caractérisée par la présence de taches brunâtres (A) contrairement à la tranche non traitée (B) (Loria et al. 2006).

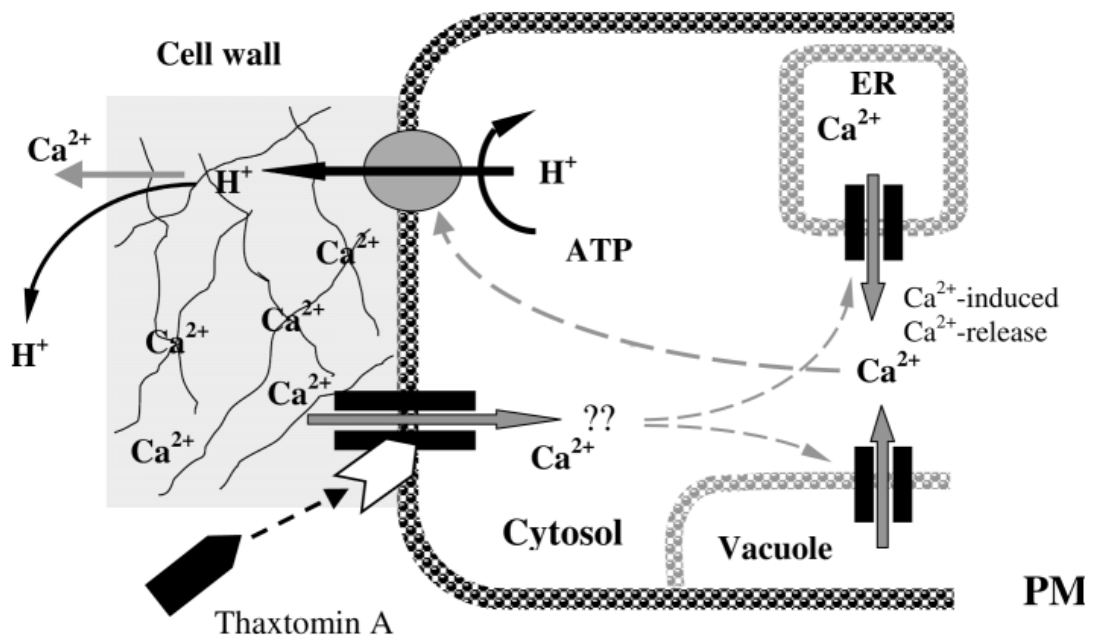
#### 2.6.1.4 Activité biologique de la thaxtamine

L'activité biologique de la thaxtamine a été étudiée sur des plantules de différentes monocotylédones et dicotylédones ainsi que sur des cultures liquides de cellules végétales en suspension. Il est rapidement apparu qu'une corrélation positive existe entre la concentration en thaxtamine testée et la sévérité des symptômes observés chez les organismes étudiés. En effet, à de très faibles concentrations (0,4 ng/mL) la thaxtamine induit une hypertrophie cellulaire au niveau de l'hypocotyle de plantules d'oignons ou de radis (Figure 35) ainsi que chez des cellules de tabac en suspension (Fry & Loria 2002). Des concentrations de 4 à 10 ng/mL en thaxtamine provoquent un arrêt de croissance et un gonflement latéral des racines et des tiges chez des plantules de différentes mono- et dicotylédones tandis que de plus fortes concentrations (20 à 40 ng/mL) induisent généralement une mort cellulaire (Figure 36) (King et al. 2001; Russell R King & Calhoun 2009). L'état physiologique du tissu hôte est également un paramètre déterminant sa susceptibilité à la phytotoxine. En effet, les jeunes tissus en croissances sont beaucoup plus sensibles à la thaxtamine que ceux ne présentant que peu d'activité physiologique (Fry & Loria 2002; Tegg et al. 2005).

Les effets délétères de la thaxtamine observés chez les nombreuses espèces végétales testées ont conduit à la conclusion que cette phytotoxine cible un constituant universel des cellules végétales : la paroi pectocellulosique (King et al. 2001; Fry & Loria 2002). En effet, de nombreuses études ultérieures ont montré que la thaxtamine induit - chez l'hôte végétale - des réponses physiologiques similaires à celles induites par des inhibiteurs de la biosynthèse de cellulose tel que l'isoxabène (King et al. 2001; Scheible et al. 2003; Bischoff, Cookson, Wu & W.-R. Scheible 2009; Duval et al. 2005a; Duval & Beaudoin 2009b; Brochu et al. 2010; Tegg et al. 2005; Tegg et al. 2013; Tegg et al. 2016). Par exemple, chez *A. thaliana* la thaxtamine inhibe l'incorporation de glucose dans la fraction cellulosique de la paroi ce qui engendre une diminution de la rigidité de cette dernière. En compensation on observe une augmentation de la production d'hémicellulose et de pectine, mais également une accumulation ectopique de lignine chez l'hôte (Scheible et al. 2003; Bischoff, Cookson, Wu & W.-R. Scheible 2009). Bischoff et ses collègues suggèrent que cette inhibition de la synthèse de cellulose est une conséquence de la diminution du nombre de complexes CESAs<sup>9</sup> observés au niveau de la membrane cytoplasmique en présence de thaxtamine (Bischoff, Cookson, Wu & W.-R. Scheible 2009). Les mécanismes par lesquels la thaxtamine agit sur la localisation des complexes CESAs ne sont pas connus ; cependant certains auteurs suggèrent que la phytotoxine pourrait activer l'endocytose précoce de ces complexes CESAs (Tateno et al. 2016).

---

<sup>9</sup> La synthèse de cellulose chez les végétaux a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'un complexe constitué de trois types de protéines CESAs (Cellulose synthases A). Les CESAs sont des glycosyltransférases catalysant la synthèse de cellulose à partir d'UDP-glucose. Le complexe de CESAs est assemblé au niveau de l'appareil de Golgi avant de migrer vers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de vésicules Golgiennes (Tateno et al. 2016).



**Figure 37: Modèle représentant l'effet de la thaxtomin sur les mouvements d'ions au travers des membranes végétales**

La thaxtomin agit avec les canaux calciques des membranes cytoplasmiques (PM) des cellules végétales. Cette interaction déclenche l'ouverture de ces canaux ce qui entraîne un influx de calcium vers le cytoplasme de la cellule végétale. L'augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique est ensuite accentuée par le relargage du calcium provenant du réticulum endoplasmique (ER) et de la vacuole. Cette concentration élevée en calcium améliore à son tour l'activité des pompes à proton membranaires ce qui par conséquent induit une acidification de la paroi végétale. L'augmentation de la concentration en proton dans la paroi va notamment entraîner un déplacement des ions calcium formant des ponts salins entre les différents polymères de la paroi et ainsi favoriser l'action des expansines (voir point 2.6.4.3) (McQueen-Mason & Cosgrove 1995). Cet affaiblissement de la paroi végétale facilitera finalement la pénétration des tissus de l'hôte par les *Streptomyces* phytopathogènes (Tegg et al. 2005).

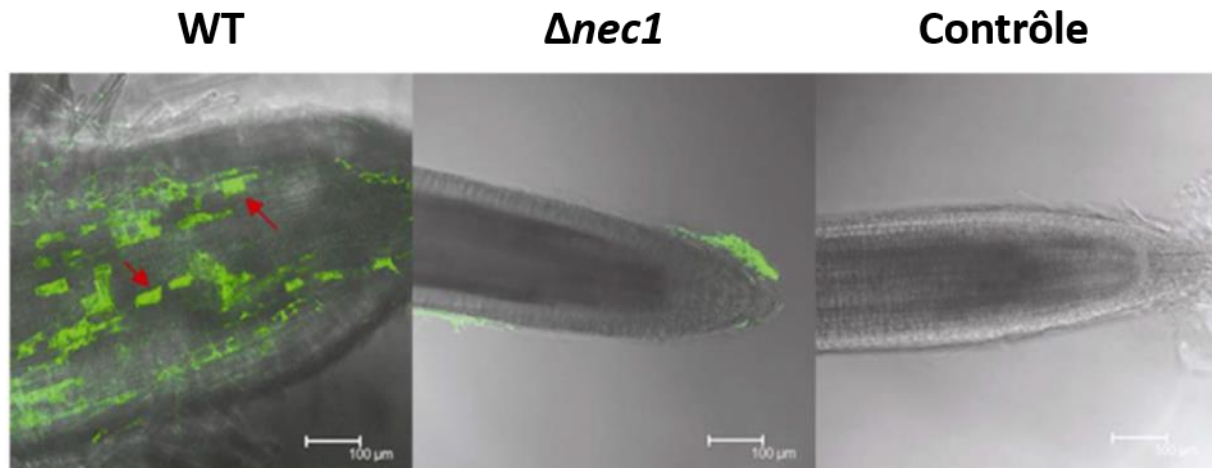
Un autre effet de la thaxtomine est qu'elle entraîne une altération du flux d'ions au travers de la membrane cytoplasmique des cellules végétales. En effet, la phytotoxine induit un influx d'ions calcium du milieu extracellulaire vers le cytoplasme ainsi qu'un efflux de protons du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Ces flux d'ions ont principalement été observés au niveau des tissus jeunes et physiologiquement actifs ce qui suggère que les cibles moléculaires de la thaxtomine seraient plus nombreuses au niveau de ces tissus (Tegg et al. 2005). Les auteurs ont proposé un modèle (Figure 37) selon lequel ces mouvements d'ions seraient dus à l'interaction entre la thaxtomine et les canaux calciques de la membrane cytoplasmique (Tegg et al. 2005). D'autres études menées par ce même groupe suggèrent également qu'il existe un lien entre les effets de la thaxtomine et les systèmes de transport d'auxine. Ces cibles n'ont cependant toujours pas été identifiées (Tegg et al. 2005; Tegg et al. 2013; Tegg et al. 2016).

L'influx de calcium observé par Tegg et ses collègues pourrait également être responsable du déclenchement du processus de mort cellulaire programmé (MCP) observé chez *A. thaliana* en réponse à la présence de thaxtomine (Errakhi et al. 2008). Cependant chez *Nicotiana tabacum* BY2 cet influx de calcium ne semble pas requis pour le déclenchement de la MCP induite par la thaxtomine (Meimoun et al. 2009). Il semble que la MCP soit simplement consécutive aux dommages causés suite à l'inhibition de la synthèse de cellulose par la thaxtomine comme cela est observé pour d'autres inhibiteurs de la synthèse de cellulose (Duval et al. 2005b; Duval & Beaudoin 2009a).

Bien que l'ensemble des mécanismes d'action de la thaxtomine ne soit toujours pas clairement élucidé à l'heure actuelle, les propriétés de cette phytotoxine en ont fait un candidat de choix en tant qu'herbicide (King et al. 2001). En effet, en plus de ses propriétés herbicides, la thaxtomine présente l'avantage d'être une molécule naturellement produite par des bactéries du sol partageant leur environnement avec de nombreux autres microorganismes capables de dégrader cette phytotoxine (Dombou et al. 1998; Lazarovits et al. 2004).

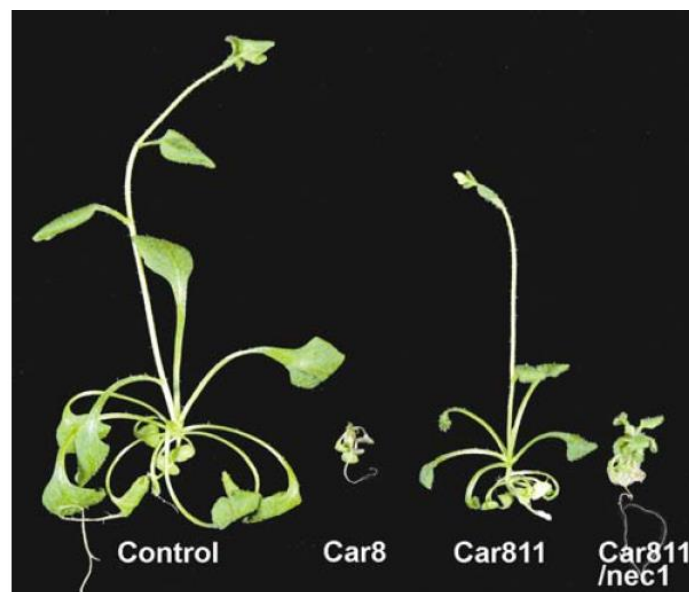
### 2.6.2 Nec1

Le gène *nec1* (*scab77062*) code pour un facteur de virulence identifié suite à l'expression dans l'espèce non pathogène de *S. lividans*, d'une banque de cosmide reprenant l'ensemble du génome de *S. scabies*. La souche transformée avec le cosmide porteur du gène *nec1* acquiert la capacité à nécroser un tissu de tubercule de pomme de terre (Bukhalid & Loria 1997). En effet, le gène *nec1* code pour une protéine sécrétée de 16 kDa capable d'induire une nécrose au niveau des tissus de tubercule de pomme de terre. Le gène *nec1* est retrouvé au niveau du premier module de l'îlot de pathogénicité (PAI) (voir point 2.7) et est donc généralement présent chez la plupart des *Streptomyces* phytopathogènes bien que certaines souches récemment identifiées en soient



**Figure 38 : Le gène *nec1* est nécessaire à la colonisation des extrémités racinaires**

Visualisation en microscopie confocale à fluorescence d'une extrémité racinaire de plantules de radis inoculés avec i) la souche sauvage *S. turgidiscabies* Car8 (WT), ii) la souche *S. turgidiscabies* Car811 ( $\Delta nec1$ ) ou iii) non inoculée (contrôle). La souche de *S. turgidiscabies* dépourvue du gène *nec1* ( $\Delta nec1$ ) reste localisée à la surface de la racine et n'est pas capable de la coloniser intra et intercellulairement comme le fait la souche sauvage (WT) (M. Joshi et al. 2007).



**Figure 39: Le gène *nec1* participe à la virulence de *S. turgidiscabies***

Une semaine après ensemencement, des plantules d'*A. thaliana* ont été inoculées avec des spores de différentes souches de *S. turgidiscabies* et incubées trois semaines supplémentaires. Les plantules inoculées avec la souche sauvage (Car8) présentent un ralentissement de croissance des tiges et des racines par rapport au contrôle (control). Les plantules inoculées avec la souche de *S. turgidiscabies* dépourvue de *nec1* (Car811) présentent un phénotype intermédiaire tandis que la souche complémentée (Car811/*nec1*) retrouve un phénotype très altéré similaire à celui des plantules inoculées avec la souche sauvage (Car8).

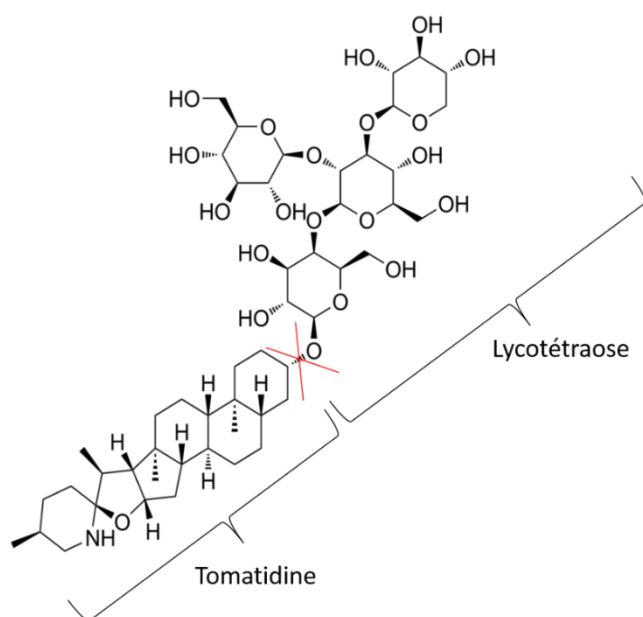


dépourvues (M. Joshi et al. 2007; Dees et al. 2013). Le gène *nec1* est particulièrement pauvre en G-C par rapport au reste du PAI ainsi qu'au génome des *Streptomyces*. Ceci suggère qu'il ait été intégré au PAI avant que celui-ci ne soit acquis par les *Streptomyces* phytopathogènes, et que cette intégration au sein du PAI a probablement eu lieu par transfert horizontal à partir d'une souche appartenant à un autre taxon (Bukhalid & Loria 1997; Kers et al. 2005). Cependant, aucun gène/protéine homologue à *nec1*/Nec1 n'a été retrouvé dans les banques de données. Nec1 est donc un facteur de virulence n'ayant jamais été identifié et caractérisé chez un autre genre que les *Streptomyces*.

Bien que les cibles moléculaires de Nec1 n'aient toujours pas été identifiées, il semble que cette protéine interagisse avec un constituant ubiquiste des végétaux (M. Joshi et al. 2007). Ces observations sont en accord avec le fait que les *Streptomyces* responsables de la gale commune n'ont pas d'hôtes ni de tissus spécifiques. Nec1 aurait un rôle durant les premières phases de l'infection chez les *Streptomyces* phytopathogènes. En effet, la capacité de la souche *S. turgidiscabies*  $\Delta nec1$  à coloniser les extrémités racinaires de plantules de radis est altérée par rapport à la souche sauvage (Figure 38). Aussi, la sécrétion de Nec1 débute endéans les 20 heures de croissance de la bactérie tandis qu'il faut attendre au minimum 48 heures pour observer la production de thaxtomine (Babcock et al. 1993; Johnson et al. 2007; M. Joshi et al. 2007). Ensemble, ces observations suggèrent que Nec1 jouerait un rôle important durant les premières phases suivant l'interaction hôte-pathogène. Les auteurs suggèrent également que ce facteur de virulence pourrait supprimer la défense de l'hôte. En effet, des plantules d'*A. thaliana* inoculées avec une souche de *S. turgidiscabies* dépourvue du gène *nec1* semblent surmonter l'infection contrairement à celles inoculées avec la souche sauvage exprimant ce facteur de virulence (Figure 39) (M. Joshi et al. 2007).

La régulation de l'expression de *nec1* semble dissociée de celle des gènes de biosynthèse de la thaxtomine. En effet, *nec1* n'est pas soumis à la répression catabolique par le glucose comme c'est le cas des gènes *txt*. La présence de glucose permettrait au contraire d'augmenter le taux de transcription du gène *nec1* (M. Joshi et al. 2007).

Bien que la protéine Nec1 ne semble pas être un facteur de virulence indispensable à la pathogénicité chez les *Streptomyces*, elle semble toutefois améliorer considérablement la virulence de l'espèce qui l'exprime. De plus, la séquence du gène *nec1* est extrêmement bien conservée parmi de nombreuses souches de *S. scabies*, *S. turgidiscabies* et *S. acidiscabies*, ce qui renforce l'idée que Nec1 reste un facteur de virulence important chez les *Streptomyces* phytopathogènes (Bukhalid et al. 2002).



**Figure 40: Structure chimique de l'α-tomatine**

L'α-tomatine est une phytoanticipine de type saponine. Elle est constituée d'un dérivé du cholestérol (la tomatidine) relié à un tétrasaccharide (le lycotétraose) constitué de deux D-glucose, d'un D-galactose et d'un D-xylose. La croix rouge indique le site de clivage de l'α-tomatine par la tomatinase TomA de *S. scabiei* (Seipke & Loria 2008).

### 2.6.3 La tomatinase TomA

Un des mécanismes de défense développés par les plantes contre les microorganismes est la synthèse de molécules toxiques de faibles masses moléculaires que sont les phytoalexines et les phytoanticipines<sup>10</sup> (VanEtten et al. 1994). Certaines de ces toxines sont des saponines c'est-à-dire qu'elles sont constituées d'un groupement de type carbohydrate relié à un triterpénoïde ou un stéroïde. C'est le cas de l'α-tomatine (Figure 40) qui est une phytoanticipine de type saponine présente dans les tissus de la tomate. La toxicité de l'α-tomatine réside dans sa capacité à se complexer aux stérols présents dans les membranes eucaryotes créant ainsi des pores induisant une lyse cellulaire (Keukens et al. 1996). Chez *S. scabiei* dont les membranes sont dépourvues de stérols l'α-tomatine semble néanmoins capable d'affecter la croissance des hyphes aériens (Seipke & Loria 2008). Cette toxicité pourrait s'expliquer par la présence - dans les membranes - d'hopanoïdes<sup>11</sup> dont les gènes de synthèses sont surexprimés durant la croissance des hyphes aériens chez *S. scabiei* (Seipke & Loria 2009).

Les tomatinases sont des glycosylhydrolases de la famille 10 capables de détoxifier l'α-tomatine en hydrolysant un ou plusieurs résidus saccharidiques de cette saponine. Ces enzymes sont généralement produites par des champignons pathogènes de la tomate tels que *Septoria lycopersici*

<sup>10</sup> A la différence des phytoalexines, les phytoanticipines sont présentes dans les tissus de la plante avant qu'il y ait eu interaction avec un pathogène ou produites après infection mais à partir d'un précurseur déjà présent dans les tissus de la plante (VanEtten et al. 1994).

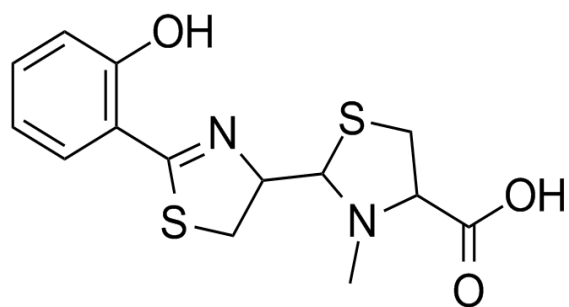
<sup>11</sup> Les hopanoïdes ont une structure similaire aux stérols et en sont des analogues fonctionnels (Kannenberg & Poralla 1999).

ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et constituent des facteurs de virulence importants pour ces microorganismes (Seipke & Loria 2008). La présence d'un gène codant pour une tomatinase chez *S. scabies* est plus surprenante étant donné que les plants de tomates ne font pas partie des principaux hôtes de ce phytopathogène. En effet, la tomatinase TomA de *S. scabies* clive spécifiquement l' $\alpha$ -tomatine en lycotétraose et en tomatidine (Figure 40) mais est incapable de dégrader les saponines de la pomme de terre que sont l' $\alpha$ -chaconine et l' $\alpha$ -solanine (Figure 34) (Seipke & Loria 2008). De plus, la délétion du gène *tomA* chez *S. scabies* n'altère en aucun cas sa virulence lors de l'infection de plants de tomates ou de tubercules de pomme de terre (Seipke & Loria 2008).

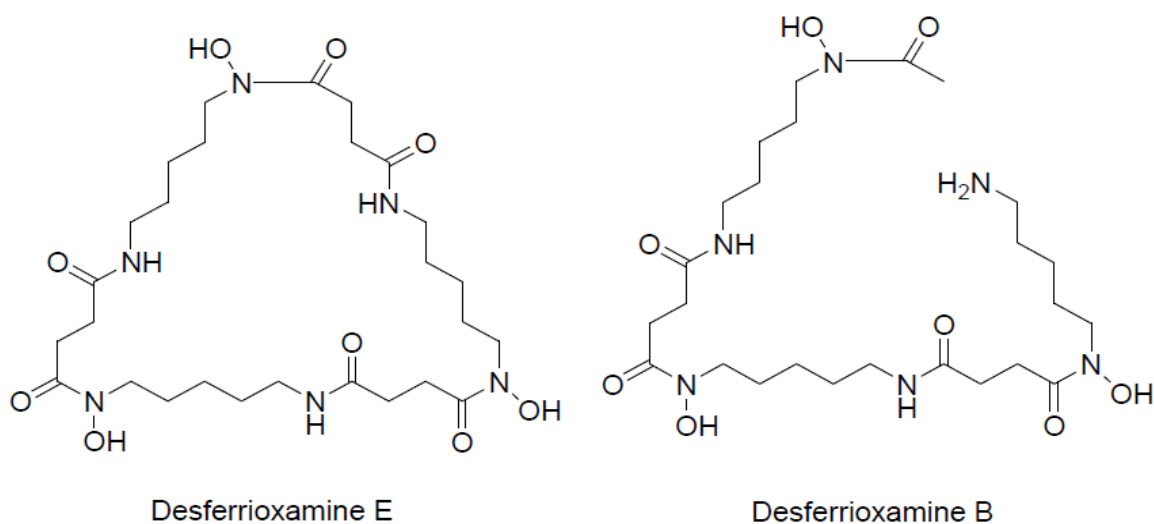
Bien qu'aucune étude n'ait démontré le rôle que joue la tomatinase chez *S. scabies*, la conservation du gène *tomA* au sein du PAI de la majorité des souches de *Streptomyces* phytopathogènes identifiés suggère que cette glycosylhydrolase pourrait, sous certaines conditions, participer à la virulence du pathogène. Par exemple, chez *Septoria lycopersici* la tomatinase est un facteur de virulence qui lui est indispensable pour infecter *Nicotiana benthamiana* qui est une espèce ne produisant pas d' $\alpha$ -tomatine (Bouarab et al. 2002).

Le gène *tomA* identifié chez *S. scabies* (*scab77321*) est localisé comme *nec1* au niveau du premier module du PAI et est conservé chez *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* (Kers et al. 2005). Il est cotranscrit avec le gène *scab77311* codant pour une glycosylhydrolase de la famille 1 (GH1) qui pourrait intervenir dans le clivage du lycotétraose. L'expression de cet opéron n'est pas induite par l' $\alpha$ -tomatine contrairement à ce qui est observé chez les autres microorganismes produisant des tomatinases (Seipke & Loria 2008). À ce jour la régulation de la transcription de ce polycistron est toujours inconnue.

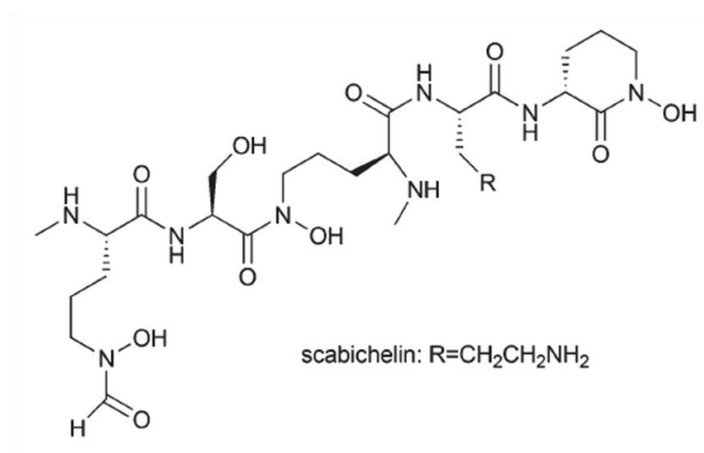
Les gènes codant pour les trois facteurs de virulence abordés jusqu'à présent (Thaxtomine A, Nec1 et TomA) sont tous situés sur le PAI et donc retrouvés chez la majorité des *Streptomyces* phytopathogènes. Toutefois, certaines souches de *Streptomyces* responsables de la gale commune ne possèdent pas le gène *nec1* ou le gène *tomA* voir même aucun des deux mais présentent cependant les gènes de biosynthèse de la thaxtomine (Dees et al. 2013). Ces deux gènes sont également absents chez *S. ipomoeae* responsable de la pourriture molle de la patate douce (Dawn R. D. Bignell et al. 2010). Ceci confirme que la thaxtomine reste le seul facteur de virulence indispensable à la pathogénicité chez ces *Streptomyces*.



**Figure 41 : Structure chimique de la pyocheline** (Quadri et al. 1999)



**Figure 42: Structure chimique des desferrioxamines B et E** (Tierrafría et al. 2011)



**Figure 43: Structure chimique de la scabicheline** (Kodani et al. 2013)

## 2.6.4 Autres facteurs de virulence associés aux streptomycètes phytopathogènes

### 2.6.4.1 Les sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites secondaires synthétisés par de nombreux microorganismes dans le but de capter le fer dans leur environnement. En effet, cet élément indispensable à la vie est généralement présent dans l'environnement sous forme de complexes insolubles comme l'hydroxyde ferrique. Une fois sécrété, les sidérophores vont chélater le fer (III) et ainsi le rendre soluble. Ce complexe sidérophore-fer sera ensuite activement transporté au sein du cytoplasme du microorganisme *via* un transporteur membranaire (Saha et al. 2013). Le fer est un élément indispensable à tous les organismes vivants. En effet, il intervient dans de nombreuses fonctions primaires du métabolisme telles que la respiration, la réplication de l'ADN ou encore la synthèse des protéines (Hantke 2001). L'acquisition du fer par l'intermédiaire de sidérophores s'est également révélée être indispensable à la virulence de nombreux microorganismes pathogènes (Dale et al. 2003; Lawlor et al. 2007; Skaar 2010; Saha et al. 2013; Luo et al. 2005).

Les pathogènes de mammifères sont les plus étudiés à ce sujet. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* produit notamment deux sidérophores, la pyoverdine et la pyocheline, directement impliqués dans la virulence de cette bactérie pathogène. En effet, la pyocheline (Figure 41) est capable de chélater le fer complexé à la transferrine ou à la lactoferrine présentes dans le sang des mammifères et permet ainsi à la bactérie d'assimiler le fer nécessaire à sa croissance. La pyoverdine, en plus de son rôle dans l'assimilation du fer, est également impliquée dans l'induction de l'expression des gènes de virulences. En effet, sa forme complexée au fer (ferripyoverdine) est perçue par un récepteur membranaire transmettant un signal induisant l'expression de gènes de virulence (Lamont et al. 2002). L'implication du fer dans la virulence des bactéries phytopathogènes a principalement été étudiée chez des espèces Gram négatives dont principalement *Pseudomonas syringae* mais également *Erwinia chrysanthemi* ou encore *Erwinia amylovora* (Seipke et al. 2011). Chez les Streptomyces, les sidérophores et le fer jouent un rôle prépondérant dans le développement, notamment dans la sporulation et la production de métabolites secondaires (Yamanaka et al. 2005; Craig et al. 2012; Lambert et al. 2014).

L'analyse du génome de *S. scabies* a permis d'identifier six clusters de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de sidérophores (Yaxley 2009). Trois d'entre eux ont été étudiés jusqu'à présent : 1) le cluster *scab57921-57981* orthologue du cluster de biosynthèse des desferrioxamines (Figure 42) chez *S. coelicolor* et *S. avermitilis* (Yaxley 2009) 2) le cluster *scab1411- 1571* qui regroupe plusieurs gènes orthologues à ceux du cluster de synthèse de pyocheline de *P. aeruginosa* (Seipke et al. 2011) et enfin 3) le cluster *scab85431-85521* unique à *S. scabies* et responsable de la production d'un nouveau sidérophore, la scabicheline (Figure 43) (Kodani et al. 2013).

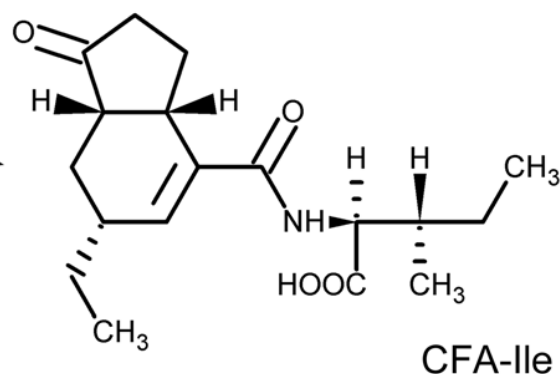
Bien que les auteurs aient démontré que *S. scabies* est capable de produire la desferrioxamine B et E (Yaxley 2009), la pyocheline (Seipke et al. 2011) et la scabicheline (Kodani et al. 2013), aucune preuve de leurs implications dans la virulence de la bactérie n'a été apportée à ce jour. Cependant, aucune de ces études n'exclut que le fer ait bien un rôle dans la virulence de *Streptomyces scabies*.

#### 2.6.4.2 La coronafacoyl-L-isoleucine

*S. scabies* produit également la coronafacoyl-L-isoleucine (CFA-L-Ile) (Figure 44) qui est un métabolite secondaire qui partage une homologie structurale avec la coronatine produite par le phytopathogène *Pseudomonas syringae* (Fyans et al. 2014). La coronatine résultant de la liaison entre l'acide coronafacique (CFA) et l'acide coronamique (CMA) *via* une coronafacate ligase (Cfl) est une phytotoxine facilitant l'invasion et la multiplication de *P. syringae* dans son hôte. Au sein du génome de *S. scabies* on retrouve un gène homologue à *cfl* ainsi que des gènes homologues aux gènes de biosynthèse du CFA mais pas du CMA (Dawn R D Bignell et al. 2010). *S. scabies* est donc incapable de synthétiser la coronatine, en revanche il produit d'autres dérivés du CFA dont l'espèce majoritaire est la coronafacoyl-L-isoleucine qui résulte de l'association du CFA et de la L-isoleucine (Fyans et al. 2014; Bown et al. 2016). À l'image de la coronatine chez *P. syringae*, la CFA-L-Ile semble jouer un rôle dans l'interaction entre *S. scabies* et son hôte. En effet, la CFA-L-Ile possède une activité biologique similaire à celle observée pour la coronatine bien que moins toxique que celle-ci (Fyans et al. 2014). De plus, la délétion des gènes de biosynthèse du CFA chez *S. scabies* réduit la virulence de ce mutant envers des plantules de tabac par rapport à la souche sauvage (Dawn R D Bignell et al. 2010).

L'expression des gènes de biosynthèse de la CFA-L-Ile est sous le contrôle de plusieurs gènes *bld*, dont *bldA*, ainsi que d'un régulateur transcriptionnel spécifique: CfaR (SCAB79591) (Dawn R D Bignell et al. 2014; Dawn R D Bignell et al. 2010; Cheng et al. 2015). Ce régulateur de la famille PAS-LuxR est constitué d'un domaine de liaison à l'ADN (LuxR) contenant un motif HTH liant une séquence quasi palindromique de 16 pb (CTAGGGATTCTCCTAG) située en amont des gènes de biosynthèse de la CFA-L-Ile, ainsi que d'un domaine senseur (PAS) modulant l'activité du régulateur suite à la perception d'un stimulus spécifique. Des études sont en cours pour déterminer la nature de ce stimulus. L'expression de CfaR semble quant à elle dépendre de la présence d'un signal ou plusieurs signaux d'origine végétale. En effet, l'expression *in vivo* des gènes de biosynthèse de la CFA-L-Ile a lieu durant la colonisation de l'hôte et *in vitro* la production de CFA-L-Ile par *S. scabies* n'a lieu que dans des milieux de culture contenant des extraits de végétaux (Fyans et al. 2014; Dawn R D Bignell et al. 2010).

Bien que la CFA-L-Ile semble jouer un rôle dans l'interaction hôte-pathogène chez *S. scabies*, aucun gène homologue aux gènes de biosynthèse du CFA n'a été identifié dans les génomes de *S. turgidiscabies* et *S. acidiscabies* (Dawn R D Bignell et al. 2010). Ceci suggère que ce type de phytotoxine ne constitue pas un facteur de virulence indispensable aux espèces responsables de la gale commune.



**Figure 44: Structure chimique de la coronafacoyl-L-isoleucine (CFA-Ile)**

#### 2.6.4.3 Les protéines de type expansine

Les expansines sont des protéines végétales sécrétées intervenant dans différents processus physiologiques nécessitant une augmentation de la plasticité de la paroi pectocellulosique. Ces protéines qui ne possèdent pas d'activité enzymatique agissent en perturbant les liaisons faibles entre les différents polymères de la paroi végétale ce qui permet à ces derniers de glisser les uns sur les autres. Les expansines sont des catalyseurs de la croissance acide des cellules végétales. En effet, la déstructuration de la paroi par les expansines couplée à la pression de turgescence intracellulaire permet l'expansion de la cellule végétale (Cosgrove 2000; Sampedro & Cosgrove 2005).

Au cours de l'évolution, les bactéries et les champignons vivant en étroite association avec les plantes ont acquis des gènes d'origine végétale codant pour des expansines. En effet, il semble qu'au moins deux événements de HGT aient eu lieu de plantes vers des bactéries ou des champignons. Si les HGTs entre eucaryotes ou entre eucaryotes et procaryotes sont extrêmement peu courants ou en tout cas peu documentés, les HGTs entre bactéries ou champignons sont beaucoup plus fréquents et ont permis la transmission de ce capital génétique entre de nombreux microorganismes. Chez les bactéries, ces gènes ont ensuite évolué indépendamment en fusionnant par exemple avec des portions d'ADN codantes pour des CBM ou des domaines d'endoglucanases (Nikolaidis et al. 2014). Néanmoins, les activités biologiques de ces expansines recombinantes restent similaires à celles des expansines végétales : elles engendrent toujours une déstructuration de la paroi pectocellulosique et ne possèdent toujours pas d'activité enzymatique (Georgelis et al. 2014).

Aujourd'hui, il est admis que l'acquisition de gènes de type expansine par les microorganismes associés aux plantes a contribué énormément à l'évolution de leurs capacités à coloniser leurs hôtes (Nikolaidis et al. 2014; Georgelis et al. 2014). En effet, différentes protéines de type expansine

identifiées chez de nombreux microorganismes se sont révélées indispensables à la colonisation de l'hôte, voire à la virulence des espèces phytopathogènes (Dawn R. D. Bignell et al. 2010).

Chez *S. scabies* deux protéines de type expansines de la famille CBM 63 ont été identifiées. Il s'agit de SCAB76661 et SCAB90061 dont l'alignement de séquence avec d'autres expansines microbiennes caractérisées a montré la présence de nombreux résidus conservés dont certains appartenant au site actif (Dawn R. D. Bignell et al. 2010). De plus la modélisation de ces deux protéines a révélé une homologie structurale avec la protéine YoaJ de *Bacillus subtilis*. YoaJ est une protéine de type expansine directement impliquée dans la colonisation des racines par *B. subtilis* (Kerff et al. 2008; Dawn R. D. Bignell et al. 2010). Étant donné le rôle des protéines de type expansines dans la colonisation de l'hôte, les protéines SCAB76661 et SCAB90061 pourraient jouer un rôle prépondérant chez *S. scabies*. Les analyses préliminaires du mutant  $\Delta scab76661$  suggèrent en effet que ce gène pourrait contribuer à la virulence de *S. scabies* (résultats non publiés) (Dawn R. D. Bignell et al. 2010).

#### **2.6.4.4 Les phytohormones**

##### **L'auxine**

L'auxine ou acide 3-indole-acétique (IAA) est une hormone végétale impliquée dans la croissance et le développement des plantes. Néanmoins, cette phytohormone est également synthétisée par de nombreux microorganismes du sol. En effet, on estime qu'environ 80 % des bactéries isolées de la rhizosphère sont capables de la produire. Bien que la production d'auxine par certaines bactéries puisse être bénéfique pour les plantes, certains phytopathogènes utilisent cette hormone afin de favoriser leur pénétration et leur prolifération dans l'hôte végétal. Cette hormone joue donc également un rôle très important dans l'interaction entre les plantes et les bactéries du sol (Spaepen & Vanderleyden 2011; Dawn R. D. Bignell et al. 2010).

Chez *S. scabies* comme chez beaucoup d'autres streptomycètes non pathogènes, la production d'auxine a lieu à partir de tryptophane et de deux enzymes de biosynthèse que sont laaM (SCAB75511) (tryptophane-2-monooxygénase) et laaH (SCAB75501) (Indole-3-acetamide hydrolase). Cependant, la contribution de l'auxine dans la virulence de *S. scabies* n'a toujours pas été clairement établie à ce jour (Dawn R. D. Bignell et al. 2010).

##### **Les cytokinines**

Les cytokinines sont des phytohormones notamment impliquées dans la division, la croissance et la différenciation cellulaire. *S. turgidiscabies* est actuellement la seule espèce de *Streptomyces* capable de produire ce type d'hormone. En effet, le second module de son PAI contient un cluster de gènes homologues à ceux de l'opéron *fas* responsable de la biosynthèse de cytokinines chez *Rhodococcus fascians* (Huguet-Tapia et al. 2011). Les cytokinines produites par une souche de *S.*



*turgidiscabies* ne produisant pas la thaxtomine ( $\Delta$ nos), lui permettent notamment d'induire des symptômes similaires à ceux de la gale des feuilles causée par *R. facians* (Joshi & Loria 2007).

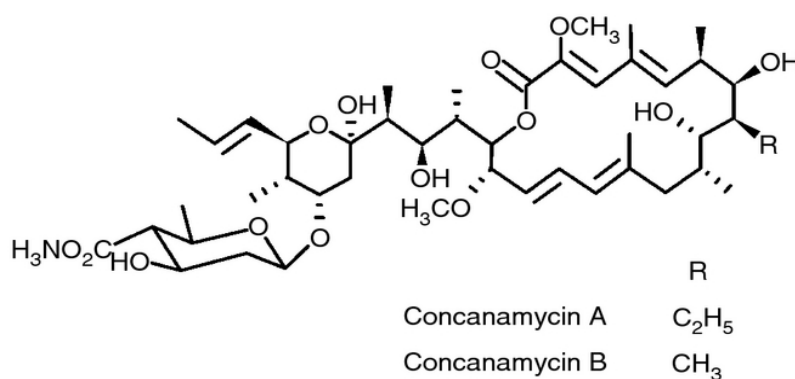
#### 2.6.4.5 Les facteurs de virulence de type macrolide

Les facteurs de virulence décrits dans cette partie du manuscrit seront peu détaillés, car souvent propres à certaines souches de streptomycètes phytopathogènes identifiées localement au niveau de zones géographiques restreintes et présumées peu répandues à travers le monde.

##### 2.6.4.5.1 Les concanamycines

Les concanamycines sont des métabolites secondaires isolées pour la première fois d'une culture de *Streptomyces diastatochromogenes* (Kinashi et al. 1984). Elles n'ont pas de propriétés antibactériennes, mais présentent cependant des propriétés antifongiques et antinéoplasiques. Les activités biologiques des concanamycines proviennent des leurs capacités à inhiber les ATPases de type vacuolaire (Kinashi et al. 1984; Seki-Asano et al. 1994).

Les premières souches de *S. scabies* capables de produire les concanamycines A et B (Figure 45) ont été isolées au Japon en 1996 (Natsume et al. 1996). Il a été observé que ces métabolites entraînent une inhibition de la croissance racinaire chez des plantules de riz cependant aucune preuve n'a été apporté quant à la participation des concanamycines dans le développement de la gale commune chez les *Streptomyces* produisant cette toxine (D R D Bignell et al. 2014).



**Figure 45 : Structure chimique des concanamycines A et B**

#### 2.6.4.5.2 Le FD-891

Le FD-891 est un métabolite secondaire de type macrolide initialement identifié à partir d'une culture de *Streptomyces graminofaciens* A-8890 (Seki-Asano et al. 1994). En 2005 ce composé a été identifié dans des cultures de différentes souches de *Streptomyces*, dont l'espèce *S. cheloniumii* responsable de la gale rousse de la pomme de terre (Natsume et al. 2005).

Ce macrolide possède une structure proche de celle des concanamycines (Figure 46), mais n'a pas pour autant le même mode d'action et ne présente donc pas les mêmes activités biologiques. Effectivement, le FD-891 est non seulement capable d'induire un retard de croissance racinaire chez des plantules de mono et di-cotylédones, mais également des nécroses au niveau des tubercules de pommes de terre (Natsume et al. 2005). Ce composé a également montré une activité cytotoxique sur des cellules animales (Seki-Asano et al. 1994)(D R D Bignell et al. 2014).

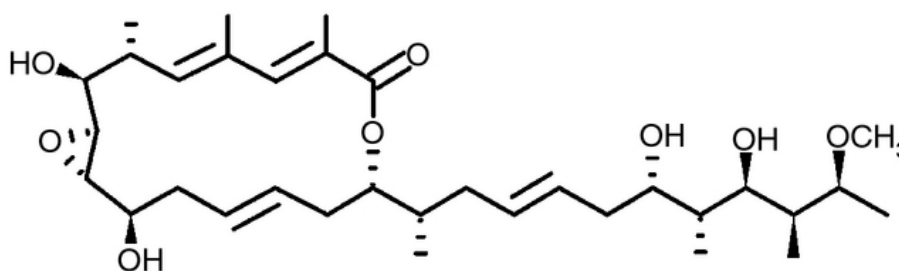
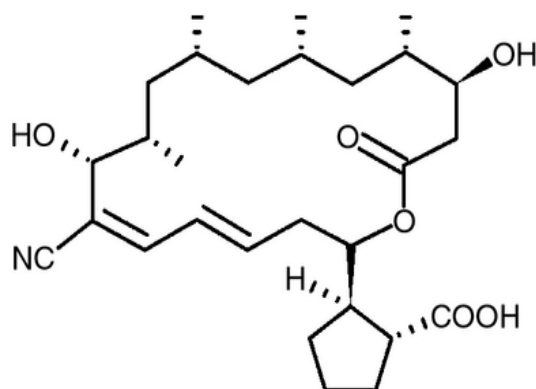


Figure 46 : Structure chimique du FD-891

#### 2.6.4.5.3 La borrelidine

La borrelidine (Figure 47) fut initialement identifiée comme un antibiotique anti-borrelia produit par une souche de *Streptomyces rochei* (Berger et al. 1949). Aujourd'hui, de nombreuses activités biologiques sont attribuées à cette toxine, en effet elle présente des activités anti-bactérienne, anti-virale, anti-malaria, anti-angiogénique et enfin phytotoxique (D R D Bignell et al. 2014). La phytotoxicité de la borrelidine a été mise en évidence suite à la découverte d'une nouvelle souche de *Streptomyces* phytopathogène (GK18) isolée d'une lésion galeuse de pomme de terre en Iran (Cao et al. 2012). En effet *Streptomyces* GK18 ne possède pas les gènes de synthèse de thaxtomine, mais cause cependant des lésions similaires à la gale commune. Les études réalisées par la suite ont montré que la borrelidine produite par *Streptomyces* GK18 était responsable des symptômes causés par cette souche bactérienne (Cao et al. 2012).



**Figure 47 : Structure chimique de la borrelidine**

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, la thaxtomine A est le principal facteur de virulence des *Streptomyces* phytopathogènes les plus répandus tels que *S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*. Cependant comme nous venons de le voir, d'autres facteurs de virulence existent et participent à des degrés divers à la virulence des différentes souches de *Streptomyces* phytopathogènes. Il est également intéressant de noter que quelques rares espèces de *Streptomyces* ont été identifiées comme causant des affections similaires à la gale commune, mais qui toutefois ne possèdent pas les gènes de biosynthèse des facteurs de virulence énoncés ci-dessus. En effet, certains auteurs ont isolé des souches de *Streptomyces* phytopathogènes ne produisant pas de thaxtomines, mais plutôt de la borrelidine (ex : *S. spp* GK18), d'autres ont même isolé des souches ne produisant ni thaxtomines, ni borrelidine, ni concanamycines (D R D Bignell et al. 2014). Ces constatations suggèrent que d'autres métabolites secondaires encore inconnus pourraient être impliqués dans la phytopathogénicité de ces *Streptomyces*.

## 2.7 L'îlot de pathogénicité

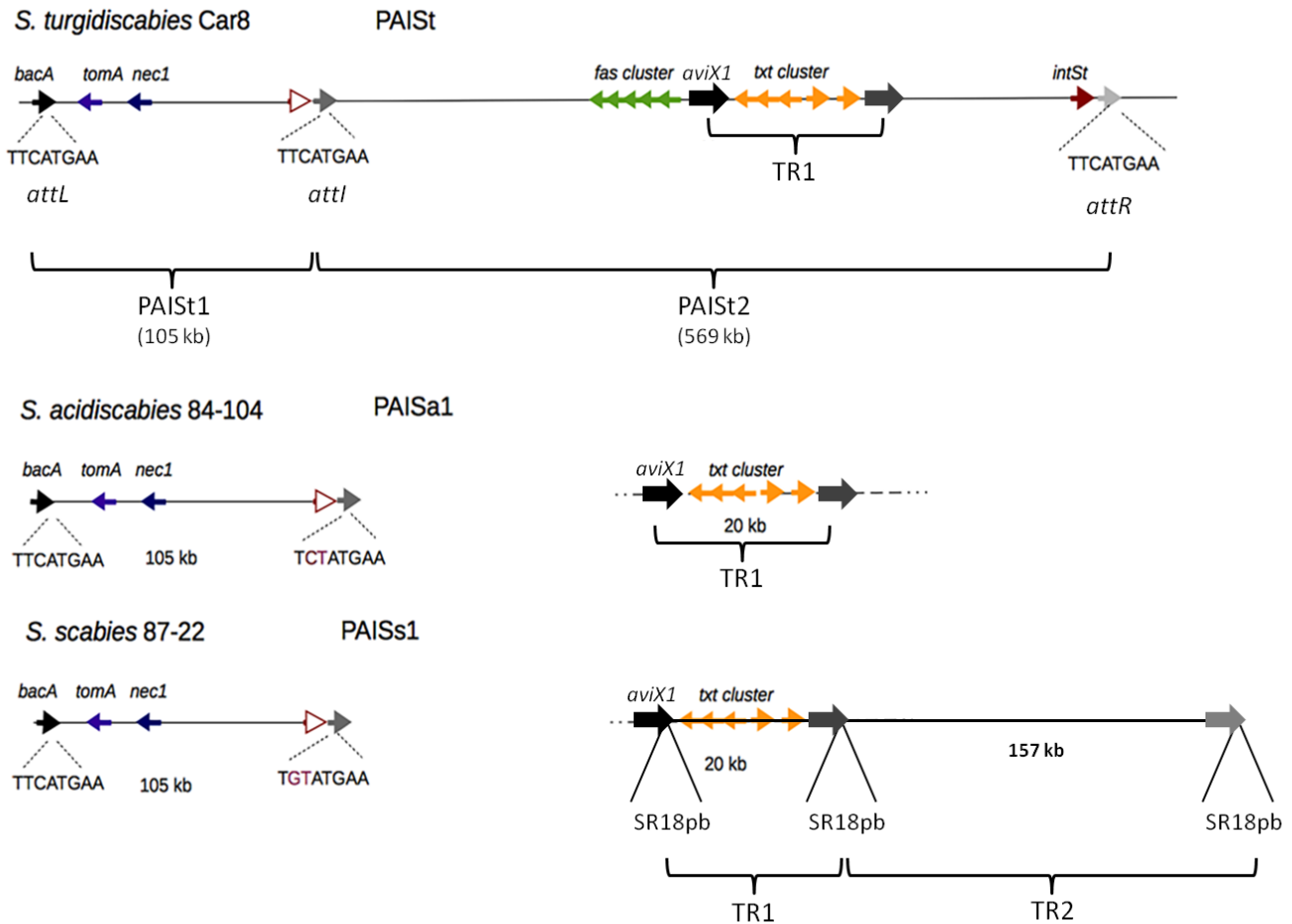
Les îlots de pathogénicité (PAI : PAthogenicity Island) appartiennent à la classe plus large des éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs : Intergrative and Conjugative Elements). Les ICEs sont des régions d'ADN chromosomique bactérien capables de s'exciser du génome sous forme circulaire et d'être transférées par conjugaison dans un hôte appartenant ou non au même genre bactérien. L'ICE peut ensuite s'intégrer dans le chromosome de l'hôte au niveau d'un site de recombinaison spécifique localisé au sein d'un locus bien conservé par exemple un gène codant pour un ARN de transfert (Burrus et al. 2002). L'intégration est réalisée par une recombinase spécifique codée au sein de l'ICE et a lieu entre le site d'attachement bactérien présent sur le chromosome de l'hôte et le site d'attachement présent sur l'ICE. Une fois intégré dans le chromosome de l'hôte, l'ICE se retrouve entre deux nouveaux

sites d'attachements (*attL* et *attR*). L'ensemble des éléments génétiques nécessaires au maintien dans le génome, au transfert et à la conjugaison de l'ICE sont codés au sein même de cet ICE. Les ICEs sont également composés de transposons, de séquences d'insertion (IS) ainsi que de gènes codant pour des recombinases spécifiques. Ces éléments permettent l'acquisition de nouveaux modules au sein de l'ICE. Ces modules peuvent coder pour de nouvelles fonctions conférant à l'hôte un avantage sélectif dans certaines conditions environnementales. Étant donné que ces ICEs sont acquis par transfert horizontal entre bactéries pouvant appartenir à des genres différents, le contenu en G-C de ces îlots est souvent différent de celui du génome du receveur (te Poele et al. 2008). Un îlot de pathogénicité est un ICE qui est (ou a été) mobile et où sont regroupés des gènes de pathogénicité ou de virulence.

La découverte du PAI chez *Streptomyces* est associée aux premières études visant à comprendre l'émergence relativement récente des nouvelles espèces de *Streptomyces* phytopathogènes que sont *S. acidiscabies* (D. H. Lambert & Loria 1989b) et *S. turgidiscabies* (Miyajima et al. 1998). En effet, en 1999 Healy *et al.* identifient une séquence d'insertion (IS 1629) dont une copie est systématiquement retrouvée à l'extrémité d'un gène de virulence (*nec1*) uniquement présent dans les génomes des *Streptomyces* phytopathogènes (Bukhalid et al. 1998; Healy et al. 1999). Ils constatent également que l'IS1629 est absente de tous les génomes de *Streptomyces* non pathogènes étudiés. De plus, le taux de G-C du gène *nec1* est pauvre comparé à celui des génomes de streptomycètes et donc vraisemblablement acquis par transfert horizontal de gènes à partir d'un autre genre bactérien. Sur base de ces résultats, les auteurs suggèrent que le transfert horizontal d'un PAI est à l'origine de l'émergence des deux nouvelles espèces *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*. L'organisation génétique ainsi que la séquence nucléotidique du gène *nec1* et de l'IS1629 chez ces trois phytopathogènes suggèrent que le transfert de ce PAI s'est opéré de l'espèce *scabies* vers les deux nouvelles espèces phytopathogènes (Healy et al. 1999). D'autres travaux indiquant que le transfert de ce PAI pourrait également avoir eu lieu avec d'autres espèces de *Streptomyces* génétiquement proches sont venus appuyer cette hypothèse par la suite (Bukhalid et al. 2002). Finalement, les preuves de l'existence d'un PAI mobile et intégratif chez *S. turgidiscabies* ont été apportées par les travaux de Kers *et al* en 2005.

#### Chez *S. turgidiscabies*

L'îlot de pathogénicité de *S. turgidiscabies* (PAISt) est le premier PAI à avoir été décrit chez une bactérie Gram-positive (Figure 48) (Kers et al. 2005). Il consiste en un large fragment chromosomique de 674 kb composé de deux modules non chevauchants de 105 kb et 569 kb (Kers et al. 2005; Huguet-Tapia et al. 2011). Le premier module de 105 kb (PAISt1) est notamment porteur des gènes *nec1* et *tomA* (voir point 2.6.2 et 2.6.3) ainsi que d'une série de gènes non caractérisés prédits comme codants pour des hydrolases sécrétées, des ABC transporteurs, des régulateurs et des systèmes à deux



**Figure 48 : Organisation génétique de l'îlot de pathogénicité chez *S. turgidiscabies* Car8, *S. acidiscabies* 84-104 et *S. scabies* 87-22.**

Chez *S. turgidiscabies* Car8, l'îlot de pathogénicité (PAI) est divisé en deux modules adjacents (PAISt1 et PAISt2) délimités par les sites d'intégration *attL*, *attI* et *attR* contenant la séquence palindromique TTCATGAA spécifique de la recombinaise IntST (flèche rouge pleine). Chez *S. scabies* 87-22 et *S. acidiscabies* 84-104, seul le premier module a été conservé (PAISs1 et PAISa1 respectivement) mais n'est plus mobilisable dû à l'érosion de la séquence codant pour la recombinaise (flèche rouge vide) et aux mutations intervenues dans les séquences palindromiques (base en rouge). La région toxicogénique (TR) est un deuxième ICE identifié chez *S. scabies* 87-22 qui est également divisé en deux régions (TR 1 et TR2) délimitées par des séquences répétées de 18 pb (SR18pb). La TR1 contenant les gènes de biosynthèse de thaxtomine est conservée chez tous les *Streptomyces* phytopathogènes responsables de la gale commune tandis que la TR2 est absente chez *S. turgidiscabies* Car8 et *S. acidiscabies* 84-104 ainsi que chez certaines souches de *S. scabies*. Figure adaptée de Tapia *et al* 2014.

composants. Le second module de 569 kb (PAISt2) encode quant à lui les gènes de synthèse de la thaxtomine (voir point 2.6.1) ainsi que l'opéron *fas*<sup>12</sup>. Le reste du module est majoritairement constitué d'ORFs codantes pour des protéines hypothétiques (Kers et al. 2005; Huguet-Tapia et al. 2011). Ces deux modules sont délimités par la présence de trois sites d'attachements (*attL*, *attI* et *attR*) contenant chacun une séquence palindromique de 8 pb (TTCATGAA) ainsi que l'extrémité 3' du gène de résistance à la bacitracine, *bacA*. Les deux modules du PAISt sont capables de s'exciser du génome sous forme d'un seul ICE à partir des sites *attL* et *attR* ou indépendamment l'un de l'autre à partir des sites *attL* et *attI* (PAISt1) ou des sites *attI* et *attR* (PAISt2) (Huguet-Tapia et al. 2014). Ces événements nécessitent l'intervention de la recombinase IntSt qui reconnaît spécifiquement la séquence palindromique de 8 pb localisée au niveau des sites d'attachements. Le gène codant pour IntSt est situé à l'extrémité 3' du PAISt2 en amont du site *attR* (Huguet-Tapia et al. 2014).

La co-cultivation de *S. turgidiscabies* avec les espèces non pathogènes *Streptomyces coelicolor* ou *S. diastatochromogenes* a révélé que le PAISt peut être transféré et intégré au chromosome de ces deux espèces hôtes. Les auteurs ont montré que l'intégration du PAISt a systématiquement eu lieu au niveau de la séquence palindromique de 8 pb (TTCATGAA) localisée à l'extrémité 3' d'un orthologue de *bacA*. Cependant, bien que les deux espèces hôtes aient acquis le PAISt, seul *S. diastatochromogenes* présentait un caractère phytopathogène. Ceci suggère que d'autres éléments, en plus de ceux véhiculés par le PAI, sont requis chez l'espèce hôte pour acquérir un pouvoir pathogène, ce qui pourrait expliquer en partie la faible fréquence d'émergence de nouveaux *Streptomyces* phytopathogènes (Kers et al. 2005).

Chez *S. scabies* et *S. acidiscabies*

L'analyse comparative des génomes de *S. turgidiscabies* Car8, *S. scabies* 87-22 et *S. acidiscabies* 84-104 a révélé que l'ensemble du premier module de 105 kb (PAISt1) est conservé chez ces trois espèces. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez *S. turgidiscabies*, ces modules (PAISs1 et PAISa1) ne sont pas mobiles chez les deux autres phytopathogènes. Cette sédentarité est expliquée par l'érosion de la séquence du gène codant pour la recombinase IntSt ainsi que par l'apparition de mutations au sein des séquences palindromiques des sites d'attachements (Figure 48) (Huguet-Tapia et al. 2014). Une autre différence majeure par rapport à *S. turgidiscabies* est que le PAISt2 n'existe pas chez *S. scabies* 87-22 et *S. acidiscabies* 84-104. En effet, seule une région de 20 kb comprenant les gènes de biosynthèse de thaxtomine est conservée (Huguet-Tapia et al. 2011; Huguet-Tapia et al.

---

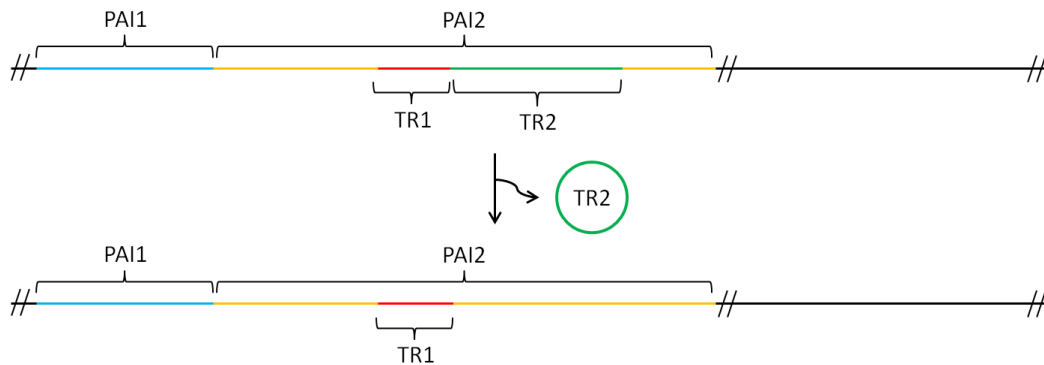
<sup>12</sup> L'opéron *fas* de *S. turgidiscabies* est hautement homologue à celui de *Rhodococcus fascians*. Chez ce dernier, l'opéron *fas* code pour une voie de biosynthèse de cytokinine et est indispensable à sa virulence (Goethals et al. 2001).

2014). De plus, cette région n'est pas physiquement liée au premier module de 105 kb comme c'est le cas chez *S. turgidiscabies* (Figure 48). En effet, chez *S. scabies* 87-22, cette région de 20 kb est située à 4,9 Mb du PAISs1 (Lerat, Simao-Beauvoir, et al. 2009). Une étude récente menée par le groupe du Professeur Carole Beaulieu de l'Université de Sherbrooke (Canada) a mis en évidence l'existence d'un nouvel ICE permettant d'expliquer le déplacement de cette région dans les génomes de *S. scabies* et *S. acidiscabies*. En effet, les auteurs ont identifié dans le génome de *S. scabies* 87-22 une région chromosomique de 177 kb qu'ils ont défini comme étant la région toxicogénique (TR) (Figure 48) (Lerat, Simao-Beauvoir, et al. 2009). Cette région est intégrée à l'extrémité 3' du gène *aviX1* codant pour une protéine liant l'ATP ou le GTP. La TR est divisée en 2 modules adjacents délimités par trois sites d'attachements caractérisés par la présence de séquences répétées de 18 pb (SR18pb). Le premier module de 20 kb (TR1) comprend les gènes de biosynthèse de thaxtamine tandis que le second module de 157 kb (TR2) contiendrait notamment les gènes nécessaires à la mobilisation de la TR. Les auteurs ont montré que les TR1 et TR2 sont capables de s'exciser du génome sous forme d'un seul ICE ou indépendamment l'un de l'autre et également que les phénomènes d'excision n'ont lieu que chez les souches porteuses du TR2. Effectivement, *S. turgidiscabies* Car8 ainsi que certaines souches de *S. scabies* et *S. acidiscabies* qui ne sont porteuses que du TR1 ne présentent jamais d'excision de celui-ci (Chapleau et al. 2015).

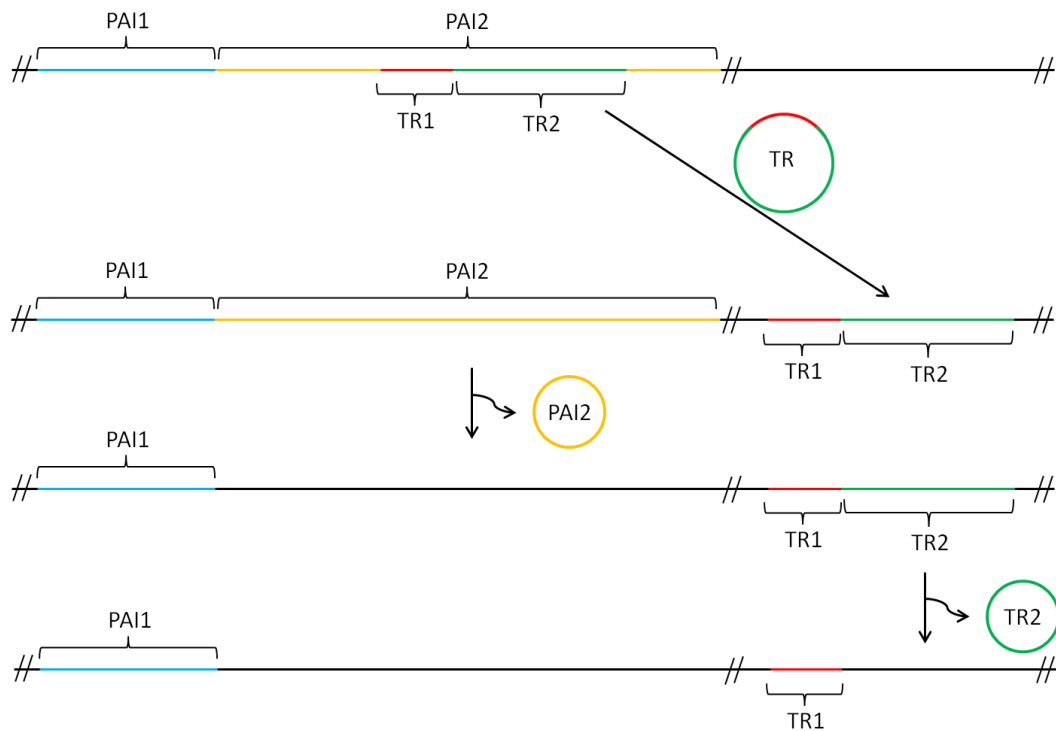
L'ensemble de ces informations nous permet de proposer un modèle d'évolution du PAI chez les *Streptomyces* phytopathogènes depuis son acquisition initiale jusqu'aux formes tronquées observées actuellement (Figure 49). Chez *S. turgidiscabies*, l'excision précoce de la TR2 nécessaire à la mobilisation de la TR1 a probablement contraint cette espèce à conserver le PAI2. En effet, la TR1 est constituée des gènes de biosynthèse de la thaxtamine qui est un facteur de virulence indispensable à la phytopathogénicité (voir point 2.6.1). Au contraire, chez les souches de *S. scabies* et *S. acidiscabies*, l'excision de la TR (1 et 2) suivit de son intégration au niveau du gène *aviX1* plus loin dans le génome a dû précéder la perte du PAI2. En effet, si les gènes nécessaires à la pathogénicité portés par le PAI2 sont uniquement codés au sein de la TR1, alors la pression de sélection a dû éliminer le reste du PAI2 chez ces espèces. Le PAI1 contenant les gènes de virulence *nec1* et *tomA* est lui, généralement bien conservé chez ces trois espèces bien qu'il ait été démontré que certaines souches pathogènes ne possèdent qu'un seul voir aucun de ces deux gènes (Dees et al. 2013) et que les facteurs de virulence codés par ces gènes ne sont pas indispensables à la phytopathogénicité (voir point 2.6.2 et 2.6.3).

Les ICEs ont donc joué et jouent toujours un rôle prépondérant dans l'apparition et l'évolution des *Streptomyces* phytopathogènes. En effet, ces ICEs sont directement impliqués dans les échanges génétiques entre espèces du même genre ou de genres différents, mais également dans le remodelage des génomes au sein desquels ils évoluent.

*S. turgidiscabies*



*S. scabies* et *S. acidiscabies*



**Figure 49: Modèle d'évolution de l'îlot de pathogénicité chez les *Streptomyces* phytopathogènes**

L'îlot de pathogénicité (PAI) chez les *Streptomyces* phytopathogènes est un ICE constitué de deux modules. Le PAI1 contient les gènes de virulence *nec1* et *tomA* tandis que le PAI2 contient un autre ICE (TR) lui-même constitué de deux modules : TR1 contenant les gènes de biosynthèse de thaxtomine et TR2 contenant les gènes nécessaires à sa mobilisation. De par leurs structures modulaires ces deux ICEs ont entraîné une réorganisation génétique du PAI différente entre les espèces de *Streptomyces* phytopathogènes voire même entre souches de la même espèce.



### 3 État de l'art et objectifs

*Streptomyces scabies* est l'organisme modèle pour l'étude de la phytopathogénicité chez les streptomycètes. Cette bactérie est l'agent responsable de la gale commune qui touche les organes de réserves des plantes racinaires telles que le navet, le radis et la betterave mais également les tubercules de pommes de terre. Cette maladie se caractérise par la formation de lésions disgracieuses à la surface de l'organe infecté ce qui en diminue fortement la valeur marchande. *S. scabies* est également capable de coloniser et d'infecter les tissus souterrains de nombreuses plantes, car cette bactérie n'est ni spécifique d'un hôte ni d'un tissu en particulier. Cette absence de spécificité est directement liée aux propriétés du principal facteur de virulence produit par *S. scabies* : la thaxtamine. En effet, cette phytotoxine agit en inhibant la synthèse de cellulose qui est le principal constituant de la paroi pectocellulosique de toutes les cellules végétales.

Comprendre quand, comment et pourquoi *S. scabies* déclenche la production de thaxtamine est donc d'un intérêt majeur pour l'étude de la pathogénicité chez les *Streptomyces* phytopathogènes. Les nombreuses études menées afin de répondre à ces questions ont permis d'identifier non seulement différentes molécules d'origine végétale induisant la synthèse de thaxtamine (principalement le cellobiose), mais également des régulateurs globaux (régulateur de type Bld) et un régulateur spécifique (TxtR) impliqués dans l'expression des gènes de biosynthèses de cette phytotoxine. Cependant, aucune voie de signalisation complète depuis la perception du signal jusqu'à la synthèse de thaxtamine n'a encore été proposée.

L'objectif général de cette thèse est donc d'élucider les mécanismes moléculaires responsables du déclenchement de la pathogénicité chez l'espèce modèle *Streptomyces scabies*. Le cellobiose étant le meilleur inducteur de la synthèse de thaxtamine chez la majorité des streptomycètes phytopathogènes, nous tenterons d'identifier les acteurs impliqués dans la perception, le transport et la modification de ce disaccharide ainsi que les régulateurs intervenant dans l'expression des gènes de biosynthèse de la thaxtamine.

Les résultats majeurs obtenus durant cette thèse seront présentés dans le chapitre suivant selon trois thématiques : 1) Identification d'un régulateur transcriptionnel directement impliqué dans l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine. 2) Identification des acteurs impliqués dans le transport des signaux induisant la production de thaxtamine. 3) Identification d'une enzyme impliquée dans la modification de ces signaux. Enfin, un dernier chapitre sera consacré à la valorisation des résultats présentant un intérêt dans l'industrie.



## 4 Results

### 4.1 Search for novel transcription factors involved in thaxtomin biosynthetic genes expression control

The thaxtomin biosynthetic genes are highly conserved across plant-pathogenic streptomycetes and lie on a pathogenicity island that is mobilized in some species (Loria et al., 2008, see also introduction point 2.7). However, acquisition of genes required for virulence is only the first step on the way to a pathogenic lifestyle. Subtle genetic changes are necessary to adapt the expression of newly acquired genes to the environment and the life cycle of the recipient microorganism. A limited number of mutations in regulatory regions and especially the distribution of *cis*-acting elements are key to developing a strain-specific transcriptional response. These DNA motifs are targeted by transcription factors that sense environmental signals through direct interaction with membrane sensors or indirect association with elicitor transporters. The production of thaxtomin A itself is under strict transcriptional control, including at least five global regulators belonging to the *bld* gene family (Dawn R D Bignell et al. 2014) in addition to the thaxtomin biosynthesis pathway-specific transcriptional activator TxtR (M. V. Joshi et al. 2007). However, the expression of *txtR* itself is not clearly understood. Indeed the overexpression of *txtR* in *S. scabies* growing on cellobiose containing media (M. V. Joshi et al. 2007) suggests that TxtR could control its own expression and/or could be regulated by an other cellobiose-dependent regulator.

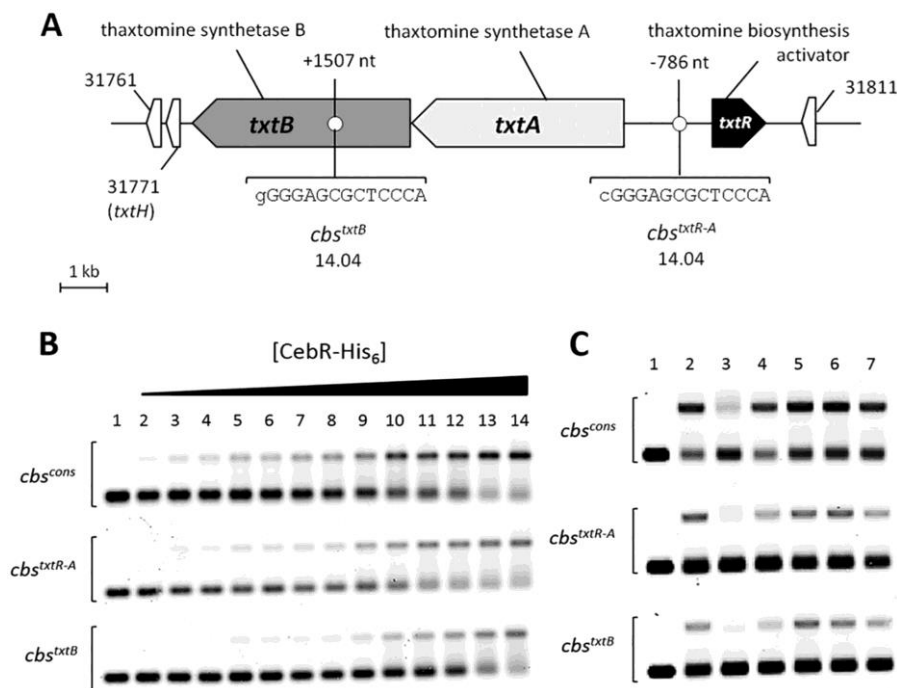
In this section, we describe an additional level of control of *S. scabies* pathogenicity. By recruiting CebR, the cellulose utilization regulator in streptomycetes (Schlösser et al. 2000; Marushima et al. 2009), we illustrate how the plant pathogen causes a *trans*-acting factor to digress from its primary function in order to use it to lock the expression of thaxtomin biosynthesis genes hence thaxtomin production and consequently its virulent behavior.

Results presented in this section has been published online in *mBio* Monday 23 February 2015 (DOI: 10.1128/mBio.02018-14; <http://mbio.asm.org/content/6/2/e02018-14.full>): '*The Cellobiose Sensor CebR Is the Gatekeeper of Streptomyces scabies Pathogenicity*' (Francis et al. 2015). This paper has been recommended in F1000Prime as being of special significance in its field by Dr. Keith Chater (<http://f1000.com/prime/725367446>), and includes data of the patent application 'A methods for thaxtomin production and modified *Streptomyces* with increased thaxtomin production' (WO2016/044527) (see Industrial applications point 5.1).

CebR targeted gene ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Score
<i>sgr4739</i>	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	A	15.24
<i>sgr3391</i>	C	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	G	12.56
<i>sgr199</i>	C	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	C	12.56
<i>sgr217</i>	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	G	14.04
<i>sgr1971</i>	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	C	14.04
<i>sgr4738</i>	A	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	A	13.95
<i>sgr6928</i>	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	A	A	14.44
<b>Consensus</b>	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	A	15.24

**Figure 50: Multiple alignment of *S. griseus* CebR-binding sites (*cbs*)**

List of experimentally validated *cbs* found upstream of targeted *Streptomyces griseus* genes (Marushima et al. 2009). Only different sequences were selected for the training set. A score is assigned to each *cbs* based on the position weight matrices generated with PREDetector software (see M&M point 8.11.3 for details).



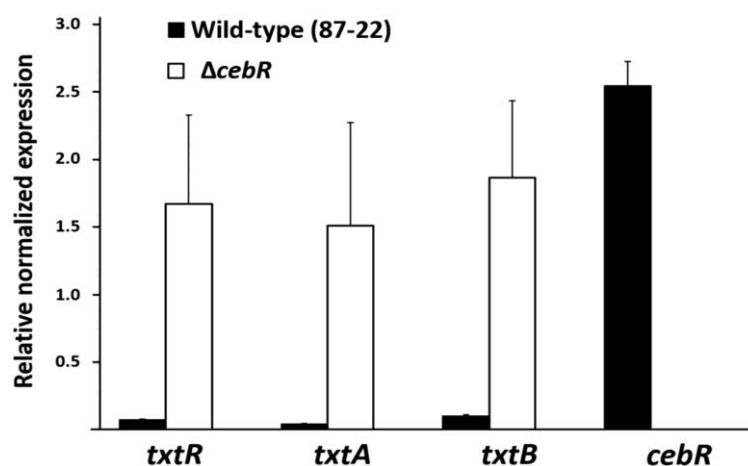
**Figure 51: CebR binding to *cbs* associated with thaxtomin biosynthetic genes is relieved by cellobiose.**

**(A)** Sequences and positions of CebR-binding sites (*cbs*) identified in the chromosome region of the thaxtomin biosynthetic genes in *S. scabies*. Numbers associated with genes/ORFs are SCAB numbers from the annotated genome of *S. scabies* 87-22. The lowercase letters indicate nucleotides that do not match with the *cbs* consensus sequence. **(B)** EMSAs demonstrating CebR binding to DNA motifs identified in the *txtRA* intergenic region (*cbs*<sup>txtR-A</sup>) and in *txtB* (*cbs*<sup>txtB</sup>). Numbers 1 to 14 refer to increasing concentrations of pure CebR-His<sub>6</sub>, i.e., 0 (free probe, 30 nM), 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560, 640, 720, 960, 1,200, 1,600, and 3,200 nM, respectively. **(C)** EMSAs demonstrating cellobiose as the best allosteric effector of CebR. Numbers 1 and 2 refer to EMSAs with free probes (6 nM) and with probes incubated with CebR-His<sub>6</sub>, respectively. Numbers 3 to 7 refer to EMSAs with CebR-His<sub>6</sub> preincubated with oligosaccharides, i.e., cellobiose (lane 3), cellotriose (lane 4), cellotetraose (lane 5), cellopentaose (lane 6), or cellohexaose (lane 7). Quantification of the shifted bands revealed that cellobiose (lane 3), cellotriose (lane 4), and cellohexaose (lane 7) were able to impair the CebR DNA-binding ability by approximately 56, 20, and 12%, respectively.

#### 4.1.1 Identification of CebR-binding sites associated with thaxtomin biosynthetic genes.

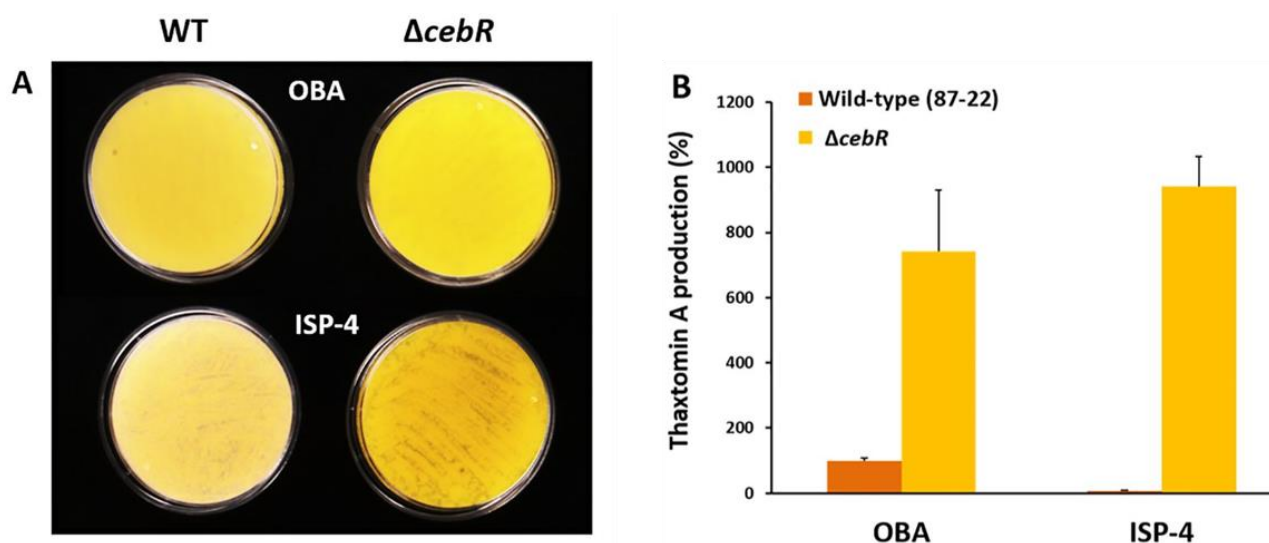
The transcription factors involved in the control of thaxtomin A production were identified by scrutinizing the genome of *S. scabies* for the occurrence of putative *cis*-acting elements of well-characterized DNA-binding proteins. Position weight matrices were generated from the compilation of DNA motifs bound by a series of regulators that were selected due to their notorious direct or indirect role in secondary metabolite biosynthesis and/or morphological differentiation in streptomycetes. The PREDetector software (Hiard et al. 2007) identified two 14-bp almost-perfect palindromic sequences highly similar to CebR boxes (henceforth called *cbs* for CebR-binding sites; see Figure 50) which are associated with the thaxtomin biosynthetic genes *txtA* and *txtB* and the pathway-specific regulatory gene *txtR* (Figure 51A). The cGGGAGCGCTCCCA sequence (*cbs<sup>txtR-A</sup>*) lies in the intergenic region between *txtR* and *txtA* at nucleotide (nt) positions -786 and -900 upstream of *txtR* and *txtA*, respectively, whereas the gGGGAGCGCTCCCA sequence (*cbs<sup>txtB</sup>*) lies at nt position -1507 within the coding sequence of *txtB* (Figure 51A). Both sequences display only a single mismatch with the previously reported 14-bp *cbs* palindromic consensus sequence TGGGAGCGCTCCCA (*cbs<sup>cons</sup>*) (Marushima et al. 2009). CebR has been identified as the repressor of cellulose/ cellooligosaccharides/ cellobiose utilization in streptomycetes (Schlösser et al. 2000; Schlösser et al. 1999; Marushima et al. 2009), and under certain conditions, this repressor has been shown to trigger morphogenesis in *Streptomyces griseus* (Marushima et al. 2009). Binding of cellopentaose or cellobiose to CebR of *S. reticuli* or *S. griseus*, respectively, relieves binding of CebR to *cbs* and allows transcription of the downstream genes (Schlösser et al. 2000; Marushima et al. 2009). Interestingly, cellobiose and cellotriose are also known as the best elicitors of thaxtomin A production in *S. scabies*, *S. acidiscabies*, and *S. turgidiscabies* (M. V. Joshi et al. 2007; Wach et al. 2007), which strengthens the possible role of CebR in controlling thaxtomin biosynthesis.

Electromobility gel shift assays (EMSAs) performed with double-stranded Cy5-labeled probes centered on the putative *cbs* sequence showed that *cbs<sup>txtR-A</sup>* and *cbs<sup>txtB</sup>* are strongly bound by CebR (Figure 51B). Under the same conditions, we also observed strong CebR binding to *cbs<sup>cons</sup>*, which was used as a positive control known to be specifically bound by CebR (Schlösser et al. 2000; Marushima et al. 2009) (Figure 51B). EMSAs performed with CebR preincubated with cellobiose or cellooligosaccharides [(glucose)<sub>3</sub> to (glucose)<sub>6</sub>] revealed that cellobiose was the best allosteric effector, disabling CebR from binding to its DNA targets (Figure 51C). Our *in silico* prediction of *cis*-acting elements and the subsequent experimental *in vitro* validations allowed us to propose the following working model: once inside the cell, cellobiose and, to a lesser extent, cellotriose prevent the binding of the CebR repressor to *cbs<sup>txtR-A</sup>* and *cbs<sup>txtB</sup>*, which allows expression of *txtA*, *txtB*, and *txtR*.



**Figure 52: Effect of *cebR* deletion in *S. scabies* on the transcription levels of the thaxtomin biosynthetic and regulatory genes.**

qPCR analysis of gene expression levels in *S. scabies* 87-22 and in the  $\Delta cebR$  strain. Data were normalized using the *gyrA*, *murX*, and *hrdB* genes as internal controls. Mean normalized expression levels ( $\pm$  standard deviations) from three biological replicates analyzed in triplicate are shown. qPCR experiments were performed by Dr Isolde Francis (University of Florida).

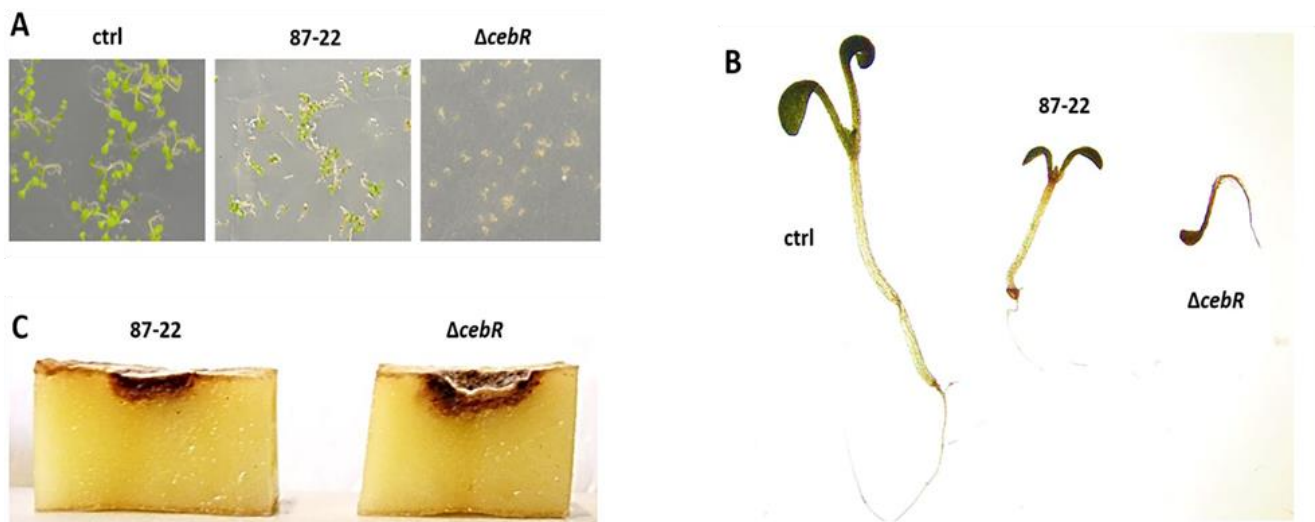


**Figure 53: Effect of the *cebR* deletion on thaxtomin production in *S. scabies*.**

(A) Deletion of *cebR* in *S. scabies* resulted in higher thaxtomin production (yellow pigmentation) than in the wild type on OBA and even under conditions which do not trigger thaxtomin production in the wild-type strain 87-22 (on ISP-4). (B) HPLC analysis of thaxtomin A extracted from plates shown in panel A.

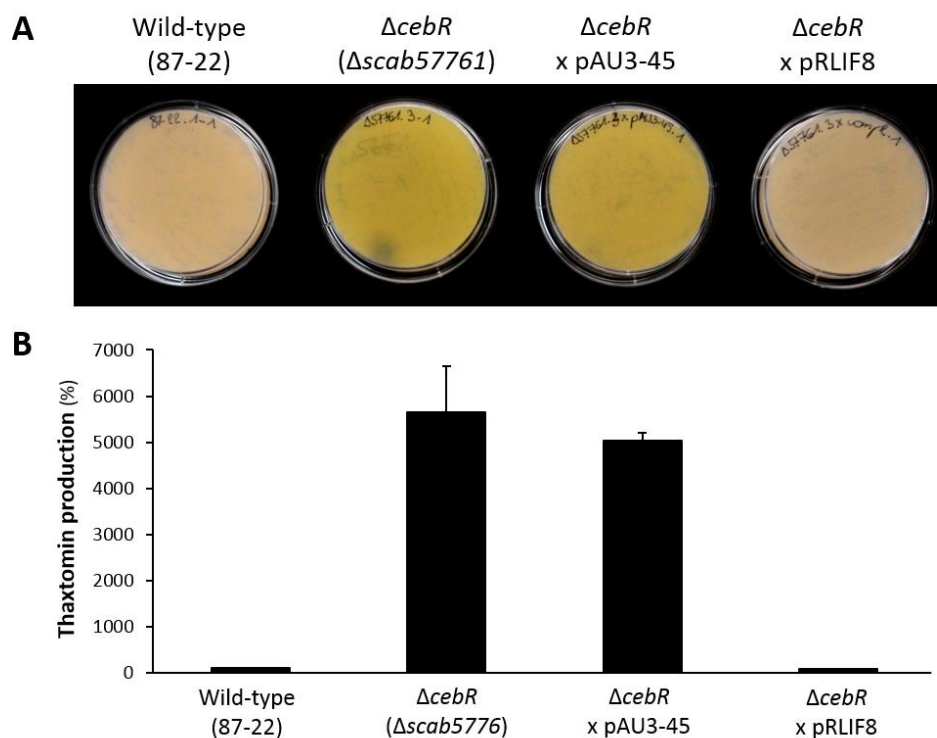
#### 4.1.2 Deletion of *cebR* results in constitutive production of thaxtomin A.

In order to uncover the role of CebR in controlling the expression levels of the thaxtomin biosynthetic genes *txtA* and *txtB*, we generated a *cebR* null mutant in *S. scabies* ( $\Delta$ *cebR* mutant). Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qPCR) on RNA extracted from wild-type *S. scabies* (87-22) and its *cebR* null mutant grown on International *Streptomyces* Project medium 4 (ISP-4) showed that the deletion of *cebR* results in overexpression of *txtA*, *txtB*, and *txtR*, respectively (Figure 52). CebR thus acts as a transcriptional repressor of the thaxtomin biosynthetic genes in *S. scabies* as it represses the expression of the cellulolytic system in other actinobacteria including *S. griseus*, *S. reticuli*, and *Thermobifida fusca*. This result confirms that, despite the unusual positions of *cbs*<sup>*txtR-A*</sup> and *cbs*<sup>*txtB*</sup> further upstream of the target *txtA* and *txtR* genes and within the coding region of *txtB* (Figure 51A), respectively, the identified-DNA-motifs are truly functional *cis*-acting elements. Moreover, the search for similar sequences in other thaxtomin A-producing *Streptomyces* pathogens confirmed the occurrence of *cbs* in their thaxtomin biosynthetic regions. In *S. acidiscabies*, three *cbs* signatures were identified within the thaxtomin biosynthetic cluster, i.e., one upstream of *txtA* (nt - 787), one within *txtA* (nt +32), and one within *txtB* (nt +1559). In *S. turgidiscabies*, we found one *cbs* signature within *txtA* (nt +32) and one within *txtB* (nt +1508). A third *cbs* is found at nt position -1444 upstream of *txtR*. No *cbs* associated with thaxtomin production could be identified in *S. ipomoeae*, which produces mainly thaxtomin C, a phytotoxic member of the thaxtomin family; thaxtomin C production is not responsive to cellobiose or other oligosaccharides (Guan et al. 2012). Therefore, the occurrence of *cbs* upstream of or within the *txt* genes correlates with the observed cellobiose-dependent production of thaxtomin A in characterized pathogenic *Streptomyces* species. We also assessed the thaxtomin production levels of both the *S. scabies* wild type and the *cebR* null mutant on oat bran agar (OBA), an undefined complex medium known to induce thaxtomin production (Johnson et al. 2007), and ISP-4. The *cebR* mutant overproduced thaxtomin, which is bright yellow, compared to the level of its production by the wild-type strain 87-22 on OBA (Figure 53A). More strikingly, overproduction was also observed when the  $\Delta$ *cebR* strain was streaked onto plates containing routinely used *Streptomyces* ISP-4, which contains soluble starch as a carbon source (Figure 53A). Extraction of thaxtomin from the plates and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) confirmed the production of the toxin by the *cebR* mutant on ISP-4 (Figure 53B). Since the wild-type strain produced only trace amounts of thaxtomin on ISP-4, this result demonstrates that we generated a mutant able to produce thaxtomin A independently of the presence of the elicitor cellobiose. Importantly, the  $\Delta$ *cebR* mutant complemented with plasmid pRLIF8 (Table 5) carrying the *S. scabies cebR* gene and its upstream region restored the cellobiose-dependent induction of thaxtomin (Figure 55), demonstrating that the phenotype of the mutant is caused only by the chromosomal deletion of the *S. scabies cebR* gene (*scab57761*).



**Figure 54: Effect of the deletion of *cebR* on the virulence of *S. scabies*.**

(A) Phenotype of *A. thaliana* (ecotype Col-0) grown for 8 days in the presence of *S. scabies* 87-22 (wild type) and its *cebR* null mutant; (B) Closeup of representative plants grown in the MS plates shown in panel A; (C) Potato tuber slice assay.



**Figure 55 : Genetic complementation of the *cebR* mutant scored by thaxtomin production.**

(A) A visual inspection of ISP-4 plates indicates thaxtomin production by its typical yellow pigmentation. (B) HPLC analysis of thaxtomin production on ISP-4 plates. The *cebR* mutant (and the *cebR* mutant transformed with the empty pAU3-45 plasmid as a negative control for the complementation) produce thaxtomin under conditions that do not induce toxin production in the wild-type strain. Thaxtomin production reverts back to wild-type levels when the mutation is genetically complemented (*cebR* mutant transformed with pRLIF8 containing the *cebR* gene and its promoter region).



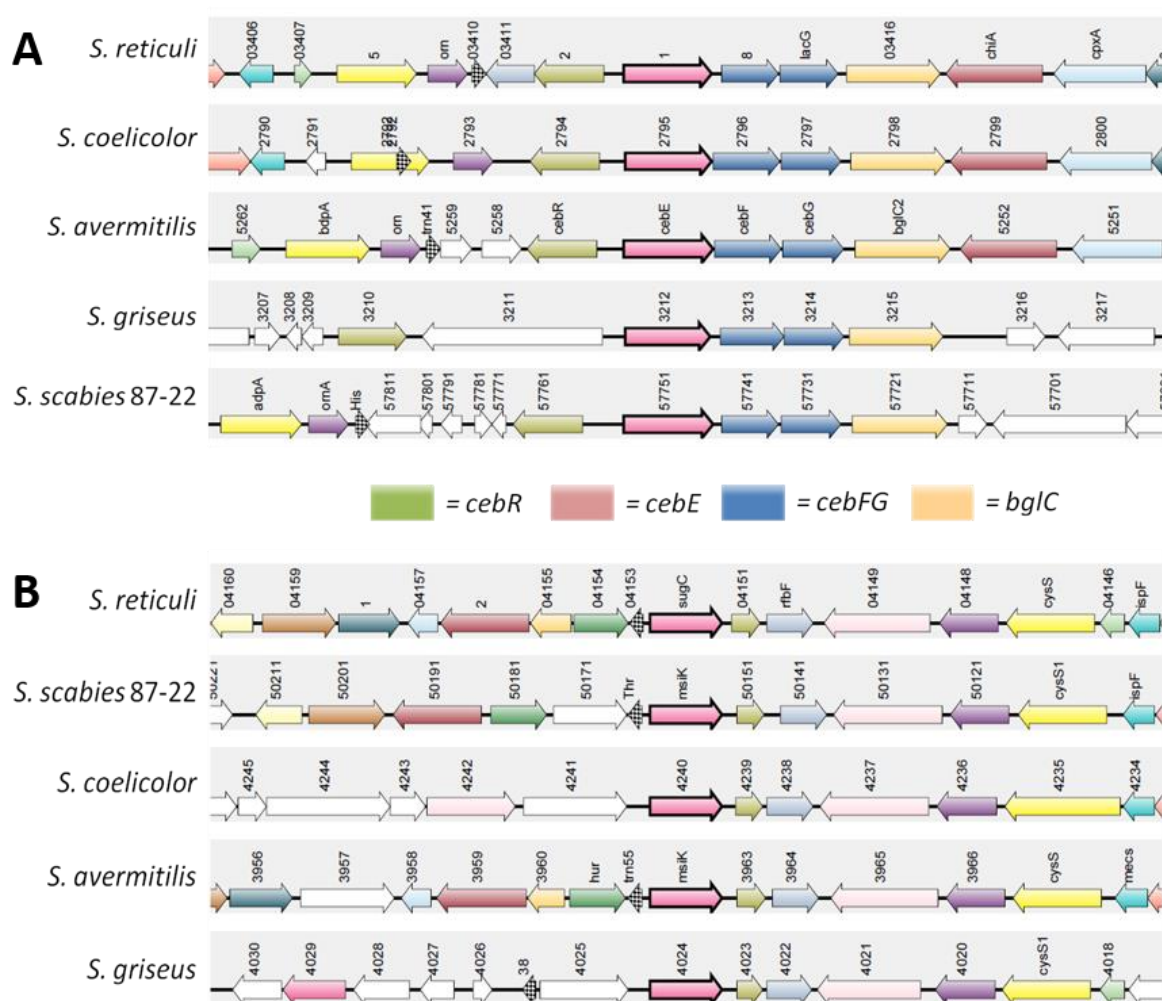
#### 4.1.3 Deletion of *cebR* leads to hypervirulence in *S. scabies*.

Since thaxtomin is the primary virulence determinant of the pathogenic streptomycetes, we evaluated the effect of *cebR* deletion on the virulence phenotype of *S. scabies*. *Arabidopsis thaliana* (ecotype Col-0) seeds grown on Murashige-Skoog (MS) agar were inoculated with spores of *S. scabies* 87-22 (wild-type) and its  $\Delta$ *cebR* mutant (Figure 54A). After 8 days of growth, seedlings inoculated with the *cebR* mutant presented stronger root and shoot stunting than those inoculated with the wild-type strain (Figure 54B). In addition, we observed an increased capacity of *S. scabies*  $\Delta$ *cebR* to induce pitting and necrosis of potato tuber slices compared to that of the wild-type strain 87-22 (Figure 54C). Overall, the deletion of *cebR* resulted in a hypervirulent phenotype of *S. scabies*, confirming that CebR is the master repressor of plant pathogenicity through its impact on thaxtomin production.

#### 4.1.4 New pieces of the puzzle for thaxtomin regulation.

Regulation of virulence genes is critical for microbial pathogens and therefore often under strict control involving several layers of regulation. For thaxtomin production, one of the regulators involved is the pathway-specific TxtR protein, which acts as a transcriptional activator, inducing the expression of the thaxtomin biosynthetic genes (M. V. Joshi et al. 2007). TxtR is an AraC family transcriptional regulator (AFTR) that binds cellobiose and was thought to be the primary regulator of thaxtomin production and virulence. However, enhanced transcription of *txtR* and thaxtomin biosynthetic genes in the *cebR* deletion mutant, in the absence of cellobiose, suggests a new paradigm for the molecular mechanism by which *S. scabies* and other thaxtomin A-producing streptomycetes utilize cellobiose as a signal. Our data show that the ability of cellobiose to induce thaxtomin production is implemented primarily through relief of CebR repression upon the transcription of the thaxtomin biosynthetic genes and that specific interaction of cellobiose with TxtR is not required for it to function as a transcriptional activator (M. V. Joshi et al. 2007). Though some AFTRs require ligand binding to activate the transcription of virulence genes, this is not always the case (Yang et al. 2011). It may be that the specific interaction of cellobiose with TxtR provides a mechanism to fine-tune the regulation of thaxtomin production. However, results presented here reinforce the significance of cellobiose as a signal for thaxtomin production and, therefore, virulence and demonstrate how minor intergenic and intragenic changes in the region coding for thaxtomin biosynthesis allow CebR to act as the “gatekeeper” of pathogenicity in *S. scabies*. Likewise, *Streptomyces coelicolor* recruited DasR, the *N*-acetylglucosamine utilization regulator, to control the production of the antibiotic actinorhodin and the prodiginines (Rigali et al. 2008), as well as siderophores (Lambert et al. 2014; Craig et al. 2012), probably as a response to sensing its own cell wall degradation during programmed cell death (Chi et al. 2011). Though noteworthy, the CebR and DasR examples in *S. scabies* and *S. coelicolor*, respectively, are not sufficient for us to state that enrolling transcription factors normally devoted to primary carbon

metabolism is a common feature of streptomycetes in regulating the onset of their secondary metabolism. Finding chemical elicitors and culturing conditions that trigger the production of the so-called cryptic secondary metabolite is presented as a challenging, expensive, and time-consuming task (Aigle & Corre 2012; Zhu et al. 2014; Yoon & Nodwell 2014). By deleting *cebR*, we have been able to create a strain that produces much higher levels of thaxtomin than the natural strains produce, which will assist in getting thaxtomin onto the market (see Industrial applications point 5.1). Our studies of *S. coelicolor* and *S. scabies* thus suggest that at least some actinomycete species, by having selected by-products of the most abundant carbon and nitrogen sources on earth (cellulose and chitin or peptidoglycan) as signaling molecules, have evolved pathways simple to engineer as a means of awakening the sleeping antibiotics (Świątek et al. 2012; Martin & Liras 2010).



**Figure 56: Synteny of the *cebR-cebEFG-bglC* cluster and *msik* locus in several *Streptomyces* species.**  
**A.** The amino acid sequence of CebE from *S. reticuli* (Schlösser et al. 1999) was used as query (GenBank: CAB46342.1). **B.** The amino acid sequence of MsiK from *S. reticuli* (Schlösser et al. 1997) was used as query (GenBank: CAA70125.1). The Absynte software identified SCAB\_57751 and SCAB\_50131 (named *msiK* on the figure) as closest match of CebE and MsiK, respectively.

## 4.2 The CebE/MsiK Transporter is a Doorway to the Cello-oligosaccharide-mediated Induction of *Streptomyces scabies* Pathogenicity

After having described how cellobiose and cellotriose unlock production of thaxtomin A, we investigated and describe in this section how *S. scabies* links extracellular plant material sensing to the onset of its virulent behavior.

Since cellobiose and cellotriose have been shown to bind cytoplasm-located regulators CebR and TxtR, it strongly suggests that these sugars are transported across the membrane in order to deliver their physiological signal. Earlier work in other *Streptomyces* model species showed that the CebEFG-MsiK ABC transporter is specifically involved in the uptake of cellobiose and cellotriose (Schlösser & Schrepf 1996; Schlösser et al. 1999; Schlosser et al. 1997). CebE is the solute-binding protein which binds cellobiose and cellotriose and therefore determines the specificity of the ABC transporter (Kos & Ford 2009), whereas CebF and CebG are the transmembrane proteins that line the pore across the bacterial cell membrane. ATP hydrolysis is mediated through the action of MsiK which is the multiple sugar import ATPase associated with many different ABC transporters in streptomycetes (Hurtubise et al. 1995; Schlosser et al. 1997; Saito et al. 2008; Viens et al. 2015). Therefore we looked for orthologues genes/proteins of *cebEFG-msiK*/CebEFG-MsiK in *S. scabies* chromosome and investigated their involvement in cellobiose and cellotriose uptake and consequently in pathogenicity.

Results presented in this section have been published in *Scientific Reports* Monday 16 May 2016 (DOI: 10.1038/srep27144) 'The CebE/MsiK Transporter is a Doorway to the Cello-oligosaccharide-mediated Induction of *Streptomyces scabies* Pathogenicity' (Jourdan et al. 2016)



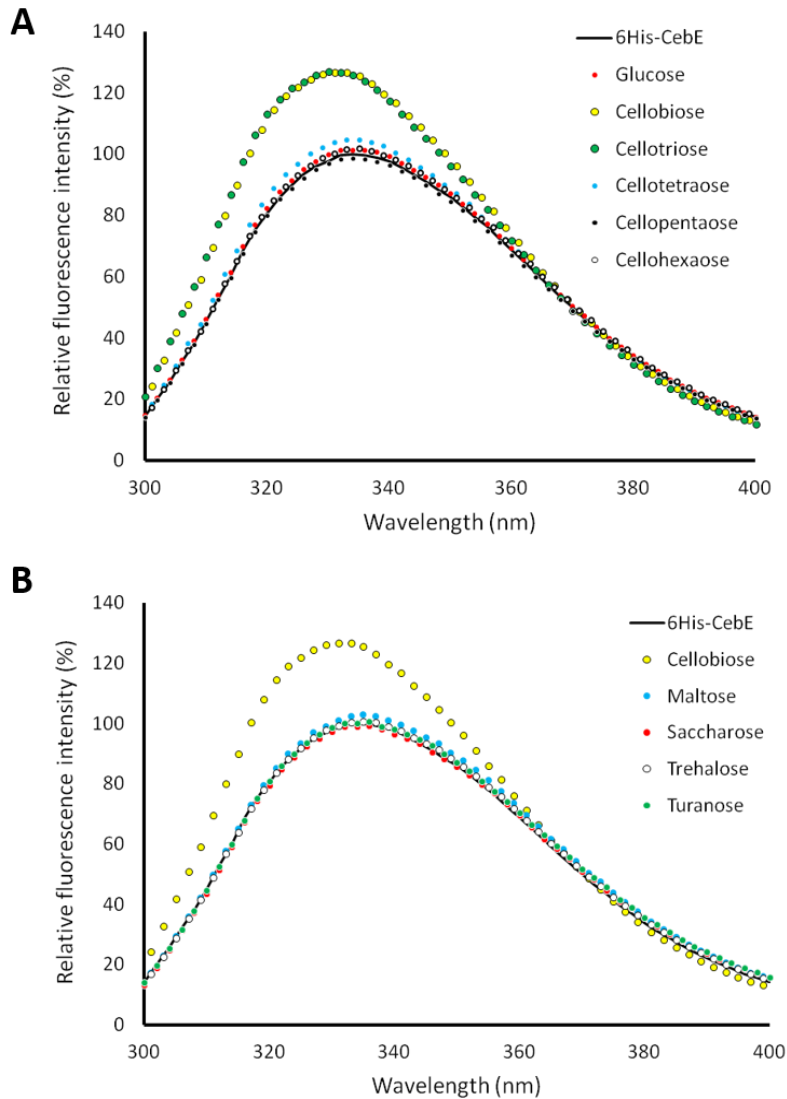
#### 4.2.1 *In silico* identification of the predicted cello-oligosaccharide transporter in *S. scabies*

Orthologues of the genes/proteins involved in cello-oligosaccharide transport in *S. scabies* were identified by a BLAST search and by using the Absynte software (Despalins et al. 2011); both of which identified *scab57751*, *scab57741*, *scab57731*, and *scab50161* as the orthologues of *cebE*, *cebF*, *cebG*, and *msiK*, respectively (Figure 56). The genes encoding the transporter components (*cebEFG*) are organized in an operon (Figure 57A), except for the gene that codes for the ATPase (*msiK*) which is located on another part of the chromosome (spaced by more than 837 kb) as usually observed in *Streptomyces*. The *cebEFG* operon is divergently oriented from *cebR* encoding the cellulose utilization repressor (Marushima et al. 2009; Schlösser et al. 2000) and which also directly controls the expression of the thaxtomin biosynthetic (*txtA* and *txtB*) and regulatory genes (*txtR*). The gene coding for the predicted  $\beta$ -glucosidase (*bglC*) for further catabolism of the incoming cello-oligosaccharides into glucose is located 146 nt downstream of the tri-cistronic *cebEFG* operon. The synteny of the *cebR-cebEFG-bglC* cluster is conserved in most *Streptomyces* species (Figure 56A).

Earlier investigations identified two other putative ABC-type solute-binding proteins that could be involved in cello-oligosaccharide transport in *S. scabies* (Lerat et al. 2010), namely the products of genes *scab2421* and *scab77271*. However, phylogeny and synteny analyses suggest that SCAB57751 (*CebE<sup>scab</sup>*) is the orthologue of CebE of *S. reticuli* (*CebE<sup>reti</sup>*) which has been experimentally demonstrated to be the cellobiose and cellotriose-binding protein (Figure 56A and Figure 57B). In addition, the *in silico* prediction of the CebR regulon identified the perfect palindromic TGGGAGCGCTCCCA CebR-binding site (*cbs*) at position -131 nt upstream of *scab57751* (*cebE*) and another predicted *cbs* at position -14 nt upstream of *scab57721* (*bglC*), further supporting the hypothesis of the involvement of this gene in cellobiose utilization (Figure 57A). Overall, the compilation of our *in silico* analyses strongly supports that *scab57751* (*cebE<sup>scab</sup>*), *scab57741* (*cebF<sup>scab</sup>*), *scab57731* (*cebG<sup>scab</sup>*), and *scab50161* (*msiK<sup>scab</sup>*) are the best candidate genes to encode the proteins of the cello-oligosaccharide-mediated induction of thaxtomin production in *S. scabies*.

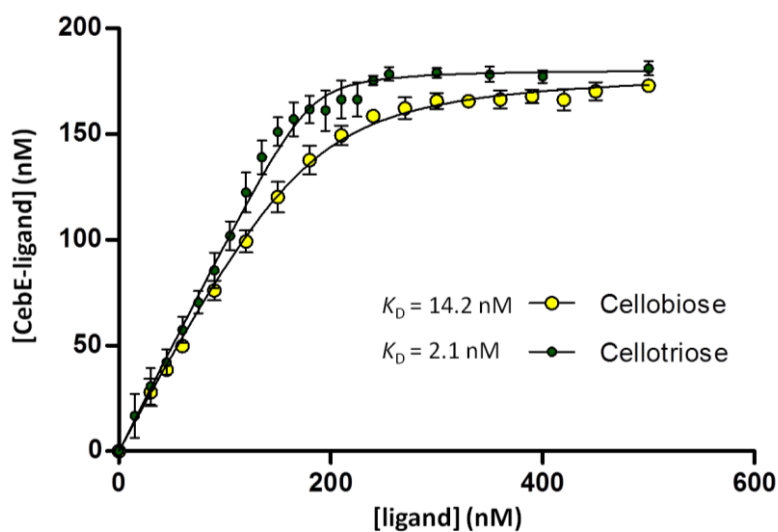
#### 4.2.2 Cellobiose and cellotriose interact with CebE of *S. scabies* at a nanomolar range

To assess if *CebE<sup>scab</sup>* can bind cellobiose and/or other cello-oligosaccharides, we used the intrinsic fluorescence of the aromatic residues of the protein to monitor conformational changes upon substrate binding. *CebE<sup>scab</sup>* includes 10 tryptophan residues (in addition to 12 tyrosine and 13 phenylalanine residues) which exhibit a fluorescence signal at a wavelength between 300-400 nm when excited at 280 nm. Modeling of the 3D structure of the CebE protein with the YASARA software (Krieger & Vriend 2014) revealed conservation of the tryptophan residue predicted to participate in the binding of carbohydrates in ABC-type sugar-binding proteins, i.e. Trp303 within the binding site of the native protein (Figure 58). As the environment of Trp303 is likely to be modified upon sugar



**Figure 59: Fluorescence emission spectra of the pure 6His-CebE protein alone and added with celooligosaccharides or other disaccharides.**

Fluorescence emission spectra of the pure 6His-CebE protein (180 nM) alone or in presence of 30  $\mu\text{M}$  of (A) glucose, cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose or cellohexaose and (B) lactose, maltose, saccharose, trehalose or turanose. CebE of *S. scabies* interacts with cellobiose and cellotriose but does not with other sugars tested.



**Figure 60: CebE of *S. scabies* interacts with cellobiose and cellotriose in the nanomolar range.**

CebE-sugar dissociation curves as a function of the cellobiose or cellotriose concentration. The fluorescence emission intensity of 180 nM 6His-CebE was measured in presence of different concentrations of cellobiose or cellotriose (from 15 to 500 nM). Each dissociation experiment was repeated 6 times. See materials and methods for details.

binding, it strengthens the rationale of using intrinsic fluorescence as a methodology to assess CebE/cello-oligosaccharide interactions.

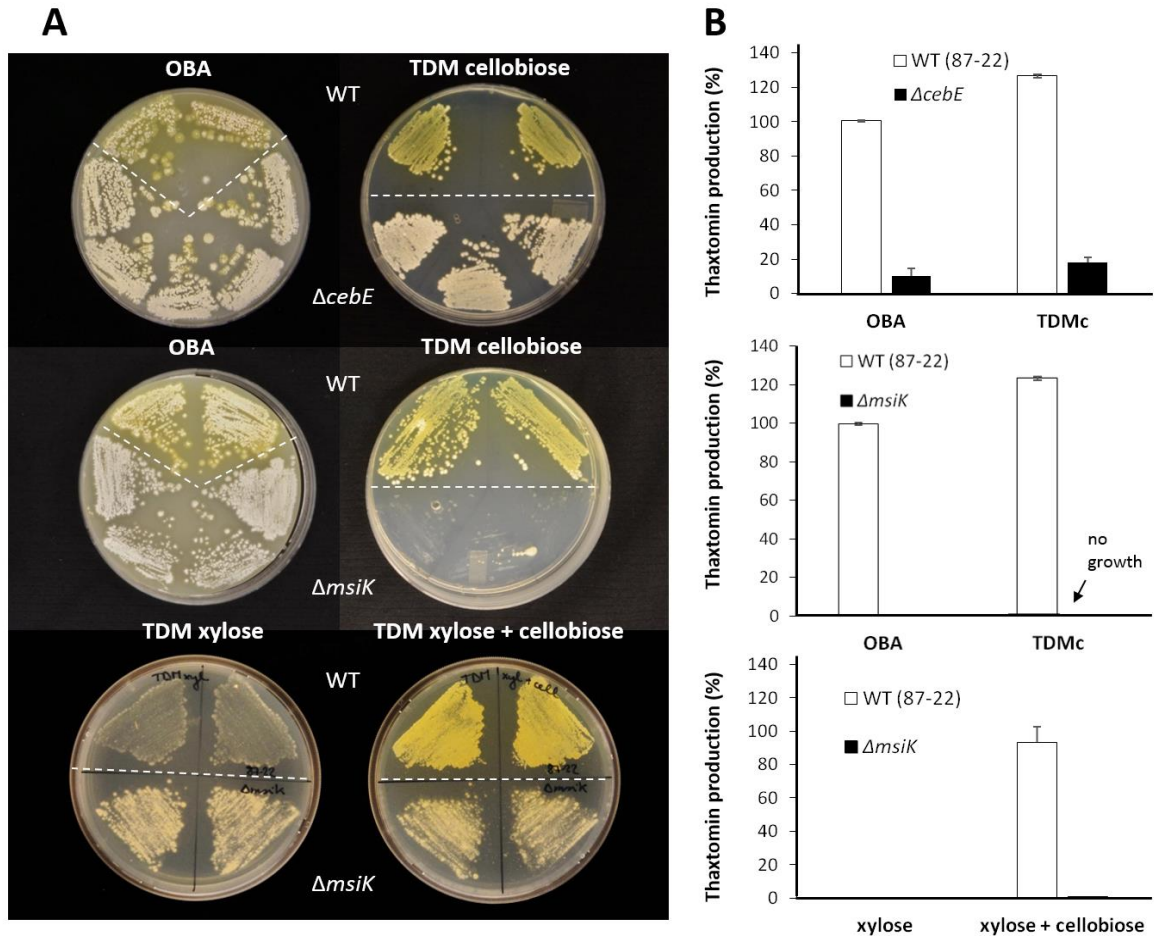
The *cebE<sup>scab</sup>* gene (*scab57751*) - without its first 44 codons encoding the peptide secretion signal and the membrane-anchoring lipopeptide - was cloned into pET-28a allowing for the production of an N-terminally 6 Histidine-tagged CebE protein (6His-CebE) in *Escherichia coli* and its subsequent purification through Ni-NTA affinity chromatography (see point 8.3 for details). We assessed the fluorescence emission spectra of 6His-CebE (180 nM) in the presence or absence of 30  $\mu$ M glucose (Glc), cellobiose [(Glc)<sub>2</sub>], cellotriose [(Glc)<sub>3</sub>], cellotetraose [(Glc)<sub>4</sub>], cellopentaose [(Glc)<sub>5</sub>], cellohexaose [(Glc)<sub>6</sub>], as well as with 1 mM of other mono- and disaccharides unrelated to the cellulose utilization pathway (Figure 59). The addition of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub> resulted in an increase of fluorescence intensity, with a moderate 'blue'-shift of the  $\lambda_{\text{max}}$  from 328 nm to 325 nm, indicating a modification of the environment of the tryptophan residues following interaction with cello-oligosaccharides (Figure 59A). In contrast, the addition of glucose and cello-oligosaccharides (Glc)<sub>4</sub>, (Glc)<sub>5</sub>, and (Glc)<sub>6</sub> neither significantly altered the fluorescence intensity between 300 and 400 nm nor caused a shift of the  $\lambda_{\text{max}}$  of 6His-CebE (Figure 59A). The disaccharides maltose, saccharose, trehalose and turanose also did not modify the fluorescence properties of 6His-CebE (Figure 59 B).

To determine if changes in intrinsic fluorescence intensity were due to a specific binding of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>, we calculated the dissociation constants ( $K_D$ ) by measuring the intrinsic fluorescence intensity of the protein in the presence of increasing concentrations of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub> (Figure 60).  $F_{\text{max}}$  could be estimated by addition of a large excess of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub> in the protein solution. Equations (1) and (2) (see point 8.4.1 page 173) were used to transform the raw fluorescence data and estimate the dissociation constants. The  $K_D$  values of cellobiose-CebE and of cellotriose-CebE complexes were determined as 14 ( $\pm$  2) nM and 2 ( $\pm$  0.5) nM, respectively (Figure 60). It is important to note that the  $K_D$  values of CebE<sup>scab</sup> for (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>, both in the nanomolar range, are 2 and about 3 orders of magnitude lower than the  $K_D$  values measured for the CebE protein of the cellulolytic species *S. reticuli* (~1.5  $\mu$ M) (Schlösser & Schrempf 1996). The very high affinity of CebE to cellotriose could be a key adaptation of *S. scabies* allowing colonization of root and tuber crops (see discussion point 6).

#### **4.2.3 Effect of the inactivation of *cebE* and *msiK* on thaxtomin production and virulence**

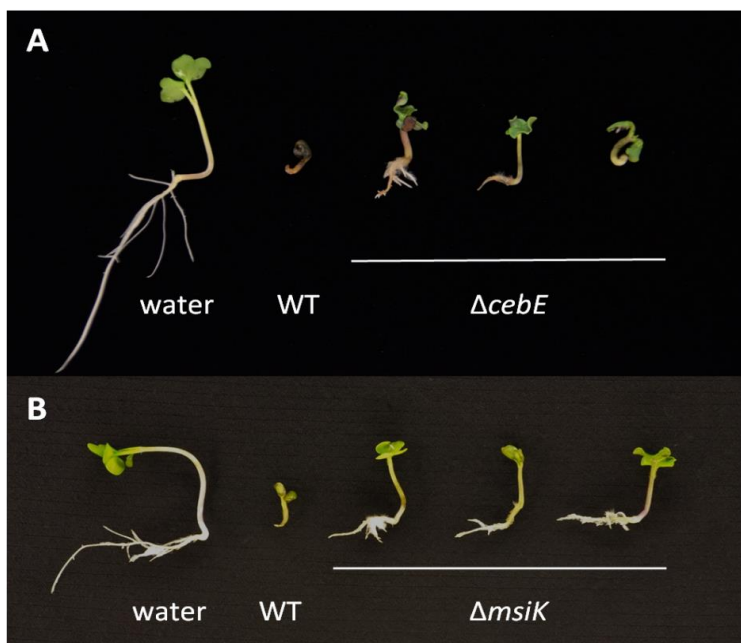
In order to know whether the cellobiose-mediated induction of thaxtomin A involves the (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>-binding protein CebE, we deleted *scab57751* by gene replacement with an apramycin resistance cassette. Similarly, the *scab50161* gene was deleted to investigate if the ATPase MsiK is involved in the uptake of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>. Oligonucleotides, constructs and protocols used for gene replacement are described in the Materials and methods section (see point 8.6) (Table 5 and Table 6).





**Figure 61: Effect of *cebE* and *msiK* deletion in *S. scabies* 87-22 on the production of thaxtomin.**

(A) Growth and thaxtomin production (yellow pigmentation) on plates. Xylose and cellobiose were both supplied at 1% final quantity (weight/volume percentage concentration). (B) HPLC analysis of thaxtomin extracted from plates. Deletion of *cebE* or *msiK* in *S. scabies* resulted in the loss of the cellobiose mediated induction of thaxtomin production.



**Figure 62: Effect of *cebE* and *msiK* deletion on the virulence of *S. scabies*.**

Phenotypes of representative radish seedlings are shown after 7 days of growth treated with water, the wild type strains 87-22, and the *cebE* deletion mutant (A) or the *msiK* deletion mutant (B).



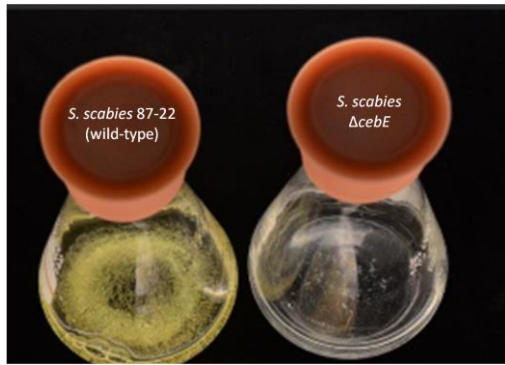
The effect of *cebE* and *msiK* deletion on thaxtomin production was first assessed by visualization of the bright yellow color associated with this toxin. The *cebE* mutant was grown on OBA plates (complex medium which induces thaxtomin production) and on TDM (minimal medium) supplied with cellobiose as carbon source. As shown in Figure 61A, this mutant lost the cellobiose-dependent induction of thaxtomin compared to the wild-type strain *S. scabies* 87-22. Surprisingly, the *cebE* mutant plated on solid TDM supplied with cellobiose as sole carbon source (TDMc) could still grow suggesting the existence of an additional uptake system for cellobiose in *S. scabies*, not involved in the thaxtomin production pathway. However almost no growth was detected when liquid TDMc was inoculated with this mutant (Figure 63). In contrast, the *msiK* mutant was unable to grow on TDMc (Figure 61A). This implies that if *S. scabies* does possess multiple cellobiose transporters, they all require MsiK to drive the import. To verify that deletion of the *msiK* gene would lead to loss of the cellobiose-dependent induction of thaxtomin, this mutant was further plated on TDM supplied with xylose (with and without cellobiose supply, abbreviated TDMx and TDMxc, respectively), a carbohydrate reported to be a carbon source that does not fully require MsiK-dependent uptake (Hurtubise et al. 1995). Indeed, as shown in Figure 61A, the *msiK* mutant was able to grow with xylose as sole carbon source, but was unable to produce thaxtomin in response to the presence of cellobiose.

Extraction of the toxin from different media and semi-quantitative analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) revealed that only 10 and 20 % of thaxtomin production remained for the *cebE* mutant grown on OBA, and TDMc, respectively, compared to the parental strain 87-22 (Figure 61B). No thaxtomin production could be detected for the *msiK* mutant on OBA, TDMx, and only 2% of thaxtomin on TDMxc compared to the wild type strain *S. scabies* 87-22 (Figure 61B).

We further evaluated the effect of *cebE* and *msiK* deletion on the virulence of *S. scabies* on radish seedlings. *S. scabies* typically causes severe root and shoot stunting, tissue swelling as well as necrosis, especially at the root tip (Figure 62). These symptoms are typically attributed to thaxtomin production (Loria et al. 1997). Both mutants showed an attenuated virulence phenotype when inoculated onto radish seedlings compared to the wild type strain (Figure 62A and B). Overall, these results (Figure 61 and Figure 62) demonstrate that transport and not sensing of cellobiose is required for the induction of thaxtomin biosynthesis and thus the virulent behavior of *S. scabies* 87-22.

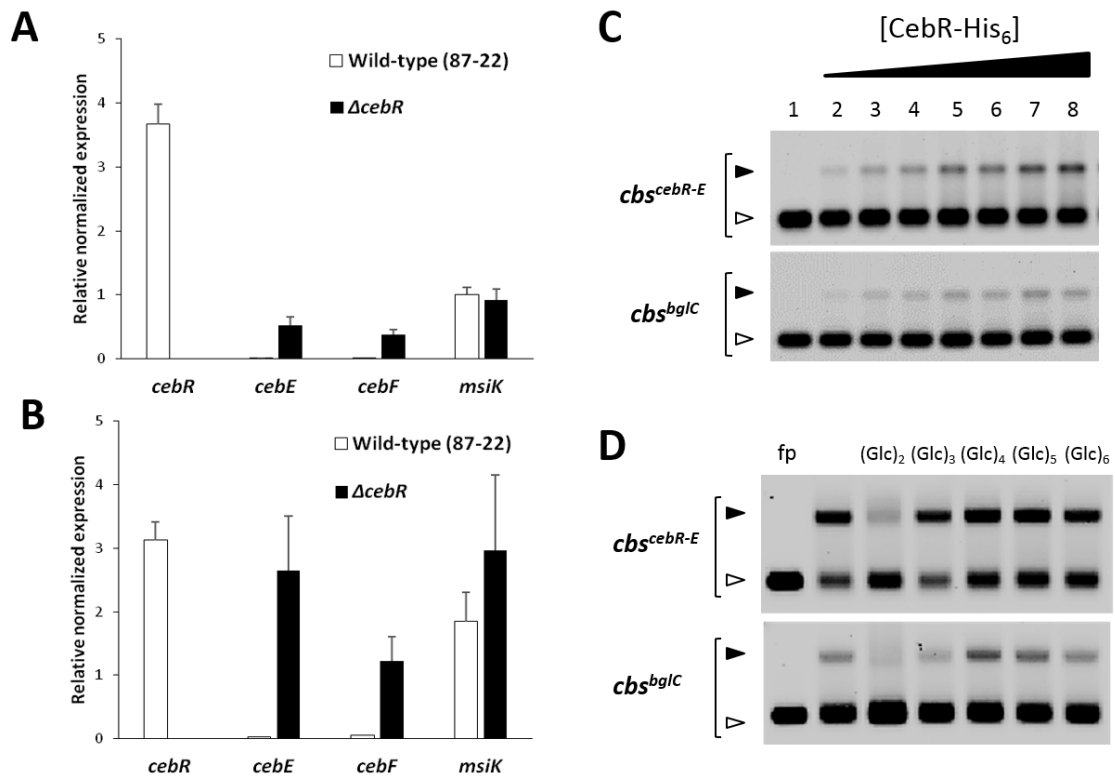
#### **4.2.4 The *cebEFG* operon is repressed by CebR and induced by cellobiose**

To further support the involvement of SCAB57751 (*CebE<sup>scab</sup>*) in cello-oligosaccharide utilization we investigated how the expression of the *cebEFG* operon was controlled by the cellulose utilization repressor CebR. Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qPCR) was performed on RNA extracted from the *S. scabies* wild-type (strain 87-22) and its *cebR* mutant grown on ISP-4 and OBA. On both media we observed that the deletion of *cebR* resulted in overexpression of *cebE* and *cebF*,



**Figure 63: Effect of *cebE* deletion on *S. scabies* growth in liquid TDM supplied with cellobiose as sole carbon source.**

Note the impaired growth of the  $\Delta cebR$  mutant in liquid medium supplied with cellobiose whereas the mutant was still able to grow on agar TDM + cellobiose plates (Figure 61A).



**Figure 64: CebR directly represses transcription of genes encoding components of the cellobiose/cellotriose-specific ABC transporter.**

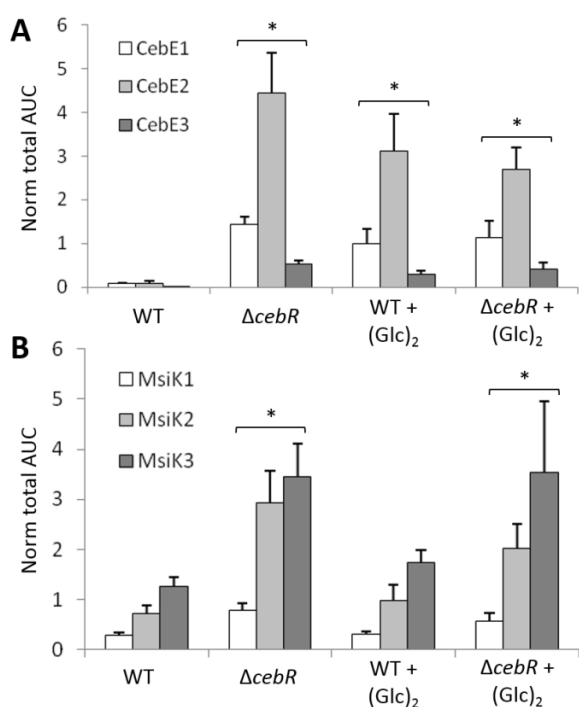
(A) and (B) Effect of *cebR* deletion in *S. scabies* on the transcription levels of *cebE*, *cebF*, and *msiK* when grown on ISP-4 (A) and OBA (B). qPCR analysis of gene expression levels in *S. scabies* 87-22 and in the  $\Delta cebR$  strain. Data were normalized using the *gyrA* and *murX* genes as internal controls. Mean normalized expression levels ( $\pm$  standard deviations) from three biological repeats analyzed in triplicate are shown. \* Denotes significant quantitative overexpression ( $p > 0.05$ ) in the *S. scabies* *cebR* null mutant compared to the wild-type strain 87-22. (C) CebR binds to the DNA motifs identified in the intergenic region between *cebR* and *cebE* (*cbs<sup>cebR-E</sup>*) and upstream of *bglC* (*cbs<sup>bglC</sup>*) (see Fig 1A for sequences and localization of *cbs*). EMSAs with increasing concentrations of pure CebR-His6, i.e., 0 30, 80, 160, 240, 320, 400, and 480 nM, respectively (numbers 1 to 8). (D) EMSAs demonstrating that cellobiose and cellotriose are able to inhibit the DNA-binding ability of CebR. Numbers 1 and 2 refer to EMSAs with free probes (6 nM) and with probes incubated with CebR-His6, respectively. Numbers 3 to 7 refer to EMSAs with CebR-His6 preincubated with oligosaccharides, i.e., cellobiose (lane 3), cellotriose (lane 4), cellotetraose (lane 5), cellopentaose (lane 6), or cellohexaose (lane 7).

whereas the expression of *msiK* was insignificantly altered compared to the wild-type levels (Figure 64 A and B). The transcriptional control of CebR on *cebEFG* expression is mediated through a direct interaction with the *cis*-acting elements located at positions -131 and -14 nt upstream of *cebE* and *bgIC*, respectively (Figure 64C and D).

The effect of the deletion of *cebR* as well as the presence of cellobiose on the production of the CebE-MsiK transporter was further assessed with a label-free, targeted liquid chromatography-multiple reaction monitoring (LC-MRM) approach. Three proteotypic peptides for CebE, and MsiK were quantitatively analyzed by MRM: ESDYLPWK, SAFDLTAK and SGNWGGSFSLVSPK for CebE, and ILDLTEYLDR, TQIASLQR and FGNSVVPVNR for MsiK. Peptides from CebE were overrepresented in extracts of the *cebR* deletion mutant or when the wild-type strain 87-22 was cultivated in the presence of cellobiose (Figure 65A). Surprisingly, while we could not detect overexpression of *msiK* transcripts through the qPCR approach (Figure 64A and B), peptides from MsiK were 3-fold overrepresented in the  $\Delta$ *cebR* background whereas their quantity was not increased upon cellobiose supply (Figure 65B). The deletion of *cebR* had a greater effect on the overproduction of CebE and MsiK than the cultivation of *S. scabiei* 87-22 on ISP-4 medium supplied with cellobiose. In agreement with their role in the virulence of *S. scabiei*, the genes for the cellobiose and cellotriose *cebEFG* transporter are induced by the incoming carbohydrates and repressed by CebR.

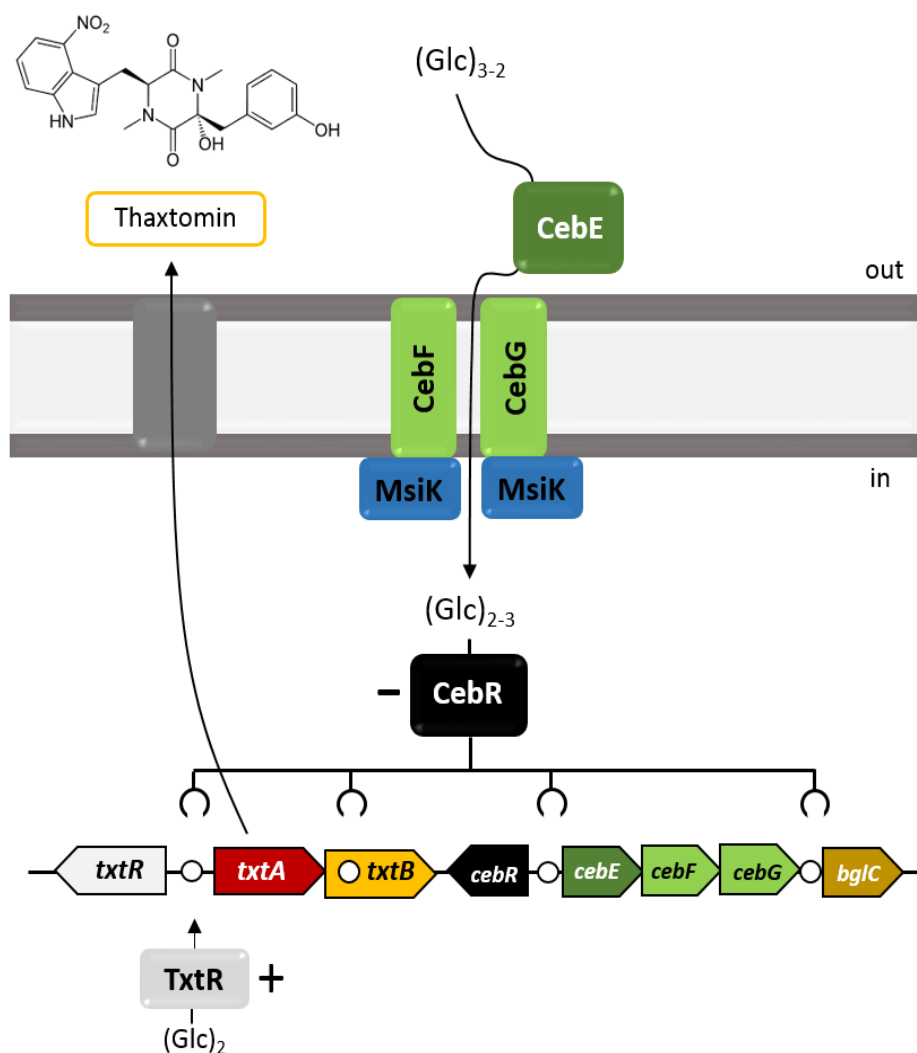
#### 4.2.5 Discussion

In this work we show that the cello-oligosaccharide-induced pathogenicity of *S. scabiei* 87-22 is mediated, at least in great part, through the CebEFG-MsiK ABC transporter system. This allows to propose a first signaling pathway from cello-oligosaccharide transport to the production of thaxtomin A in *S. scabiei*, with each step of the cascade controlled by the cellulose utilization transcriptional repressor CebR (Figure 66). Only very few other (plant) pathogens have been shown to also use carbohydrates from the host as signals to boost their virulence behavior. The best studied phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment by binding to diverse aldose monosaccharides as well as sugar acid derivatives through the periplasmic protein ChvE (Cangelosi et al. 1990; Hu et al. 2013; Kemner et al. 1997). ChvE, like CebE, is a carbohydrate-binding protein associated with an ABC transporter but the molecular mechanisms involved in triggering virulence highly differ from the one highlighted in *S. scabiei*. The ChvE-sugar complex binds to the periplasmic domain of the two-component system sensor VirA making it more sensitive to plant phenolic compounds which ultimately leads to virulence (*vir*) genes expression (Kemner et al. 1997; Cangelosi et al. 1990; He et al. 2009; Subramoni et al. 2014; Hu et al. 2013). In the *A. tumefaciens*-plant interaction, the carbohydrates emanating from the host thus participate in a three-component sensing system instead of being directly imported into the cytoplasm to target the master regulator of the process as highlighted in *S. scabiei*.



**Figure 65: Relative abundance of CebE (A) and MsiK (B) peptides in response to the deletion of *cebR* and/or cellobiose supply, determined by targeted proteomics (LC-MRM).**

Target peptides for CebE: ESDYLPWK (CebE1), SAFDLTAK (CebE2), and SGNWGGSFSLVSPK (CebE3). Target peptides for MsiK: ILDLTEYLDR (MsiK1), TQIASLQR (MsiK2), and FGNSVVPVNR (MsiK3). \* denotes significant quantitative peptide overproduction ( $P < 0.05$ ) compared to the wild-type strain grown in ISP-4 without cellobiose supply. Statistical significance was assigned by performing 2-sided Student's t-tests and assuming groups of equal variances.



**Figure 66: Model of the cellobiose /cellotriose-mediated induction of thaxtomin production in *S. scabiei*.**

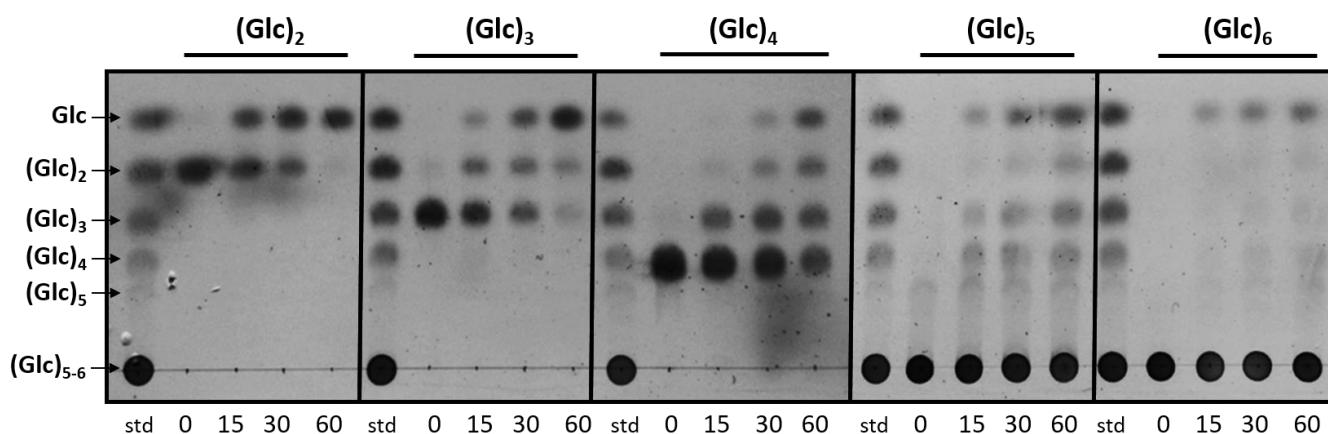
Cellobiose  $(Glc)_2$  and Cellotriose  $(Glc)_3$  are transported by the CebEFG-MsiK ABC transporter. In the cytoplasm,  $(Glc)_2$  and, to a lesser extent  $(Glc)_3$ , binds to CebR and inhibits its DNA-binding ability which further increases transcription of *cebE*, *cebF*, and *cebG*, as well as *txtR*, the specific activator of the thaxtomin A biosynthetic genes *txtA* and *txtB*. Circles (o) indicate the CebR-binding sites.

### 4.3 Role of the Beta-glucosidase BglC in the Fate of the Thaxtomin inducing Cello-oligosaccharides in *Streptomyces scabies*

This section deals with the fate of cellobiose and cellotriose once uptaken inside the cytoplasm of *S. scabies*. Indeed, beta-glucosidases are expected to be synthesized for further catabolism of the incoming cello-oligosaccharides into glucose and consequently feed glycolysis and prevent the cellobiose-mediated response including thaxtomin biosynthesis. How does *S. scabies* discriminate between (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub> as nutrient sources or instead signaling molecules that trigger its pathogenic behavior? Part of the answer could be provided by studying the enzymatic properties of its Beta-glucosidases.

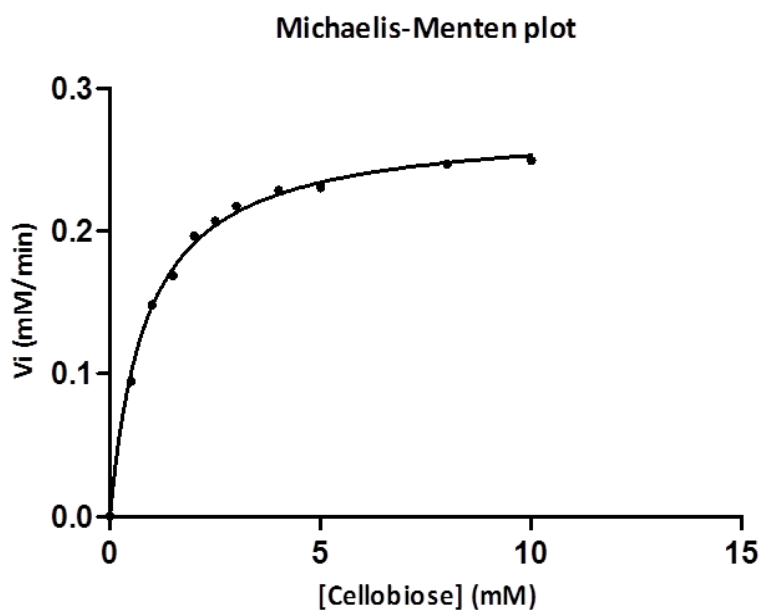
Enzymes belonging to GH1 and GH3 family are the most susceptible to possess a cellobiose/cellooligosaccharides hydrolase activity. 5 and 9 putative proteins from *S. scabies* are classified in GH1 and GH3 family, respectively. Amongst these, as mentioned in the previous section, a putative beta-glucosidase belonging to GH1 family is encoded by the gene *scab57721 (bglC)* found within the well-conserved *cebR-cebEFG-bglC* cluster which obviously promotes this *orf* as the best candidate for encoding the enzyme involved in the catabolism of the CebE-transported (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>. In addition, we previously showed that the putative TGGGAGCGCTtCCA CebR-binding site identified by the PREDetector software at position -14 nt upstream of *scab57721* is bound by the key regulator CebR (Figure 64C). Taken together, these observations support the hypothesis of the involvement of BglC in cellooligosaccharides utilization and, as a consequence, in controlling thaxtomin A production by *S. scabies*.

In this section we assessed the ability of the pure histidine-tagged BglC protein (SCAB57721) to cleave cellobiose and cellooligosaccharides, and performed a series of preliminary experiments to investigate its possible role in inducing/preventing the onset of *S. scabies* pathogenicity through modification of the transported cellobiose and cellotriose.



**Figure 67: TLC analysis of cellobiose and cello-oligosaccharides hydrolysis by purified BglC**

6.25 mM of cello-oligosaccharides were incubated with pure BglC (0.4  $\mu$ M) at 30°C for 0, 15, 30 and 60 min. st: Standard cello-oligosaccharides (cellopentaose and cellohexaose cannot migrate efficiently under these conditions and therefore are stacked at the initial spot). Glc: glucose, (Glc)<sub>2</sub>: cellobiose, (Glc)<sub>3</sub>: cellotriose, (Glc)<sub>4</sub>: cellotetraose, (Glc)<sub>5</sub>: cellopentaose, (Glc)<sub>6</sub>: cellohexaose. See methods sections for details.



**Figure 68: Curve of initial velocity of BglC (Vi) at different cellobiose concentrations**

Rates of cellobiose degradation were obtained by measuring glucose released at the beginning of the hydrolysis reaction performed in 50 mM HEPES buffer pH 7.5 at 26°C. Data were fitted to the Henri-Michaelis-Menten equation using the GraphPad Prism 5 software.

#### 4.3.1 BglC cleaves specifically cello-oligosaccharides into glucose

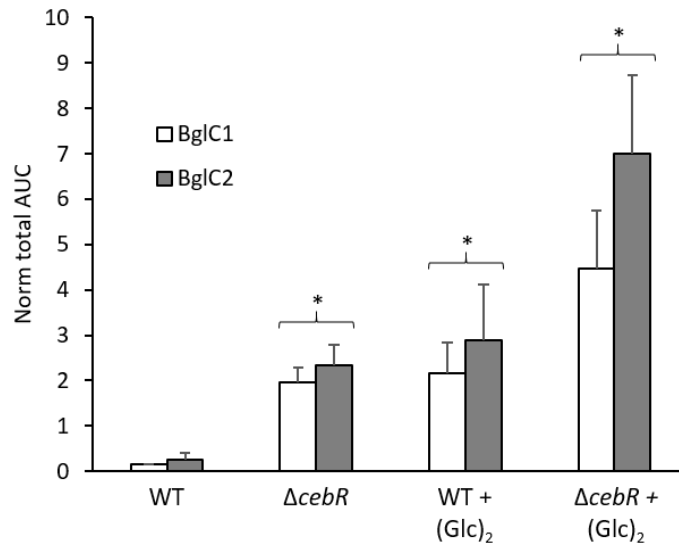
In order to assess the enzymatic properties and the substrate specificity of the putative BG located within the *cebR-cebEFG-bglC* gene cluster, *scab57721* was cloned into pET-28a for heterologous expression of a six histidine-tagged protein (BglC) in *Escherichia coli*. Purification through Ni-NTA affinity chromatography enabled to recover 6His-BglC with an apparent molecular weight which corresponds to the calculated one (54.5 kDa) (see Figure 104 at point 8.3).

To determine the substrate specificity of BglC, the recombinant protein was incubated with various cello-oligosaccharides ranging from cellobiose (Glc)<sub>2</sub> to cellohexaose (Glc)<sub>6</sub>, as well as with different disaccharides unrelated to cellulose degradation (lactose, saccharose, maltose, threulose, and turanose). Samples collected after increasing incubation times were spotted on a thin layer chromatography (TLC) plate and revealed that BglC is able to generate glucose from cellobiose and all cello-oligosaccharides tested (Figure 67). All other disaccharides tested did not reveal the release of glucose by BglC except for lactose though with significantly less efficiency than from cellobiose or other cello-oligosaccharides (data not shown).

Kinetic parameters of BglC were determined by measuring initial rate of cellobiose hydrolysis in presence of pure BglC (Figure 68). Km and kcat values are 0.77 mM and 400 min<sup>-1</sup> respectively while the Vmax value is 7.3 μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>.

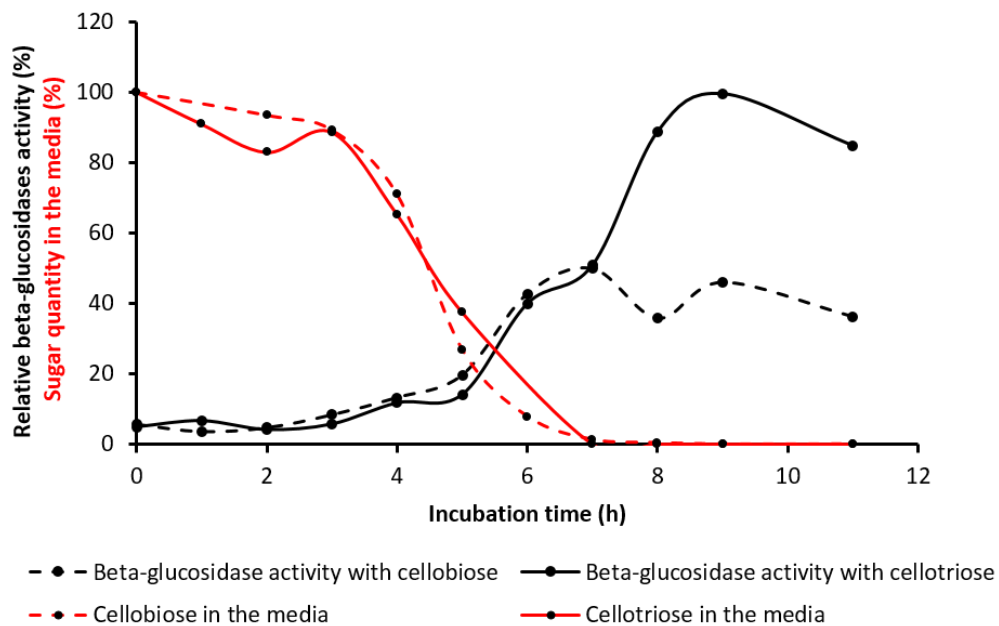
#### 4.3.2 The predicted beta-glucosidase BglC is controlled by CebR

In order to ascertain that BglC is indeed involved in the catabolism of (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub> *in vivo*, its expression must be induced by the sensing of these carbohydrates by *S. scabies* and thus under the control of the cellulose utilization repressor CebR. Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qPCR) was performed on RNA extracted from the wild-type strain of *S. scabies* (WT) and its *cebR* mutant ( $\Delta$ *cebR*) grown on ISP-4 which revealed that the deletion of *cebR* resulted in a 2.5 fold overexpression of *bglC* (Dr. Isolde Francis, personal communication). In addition, targeted LC-MRM analysis allowed evaluation of the effect of the deletion of *cebR* as well as the presence of cellobiose on BglC production in *S. scabies*. Quantitative analyses of two specific peptides of BglC LVDELLAK and TDPVASLR were found to be overexpressed in the total protein extracts of the  $\Delta$ *cebR* mutant as well as in extracts of the *S. scabies* wild-type strain grown in cellobiose-containing media (Figure 69). The observed transcriptional repression exerted by CebR and the cellobiose-dependent induction of *bglC*/BglC are mediated through direct binding of CebR to the CebR-binding site (*cbs*) identified at position -14 nt upstream of *bglC* (*cbs<sup>bglC</sup>*) (Figure 64C).



**Figure 69: Relative abundance of BglC peptides in response to the deletion of *cebR* and/or cellobiose supply, determined by targeted proteomics (LC-MRM).**

Target peptides for BglC: LVDELLAK (BglC1) and TDPVASLR (BglC2). \* denotes significant quantitative peptide overproduction ( $P < 0.05$ ) compared to the wild-type strain grown in ISP-4 without cellobiose supply. Statistical significance was assigned by performing 2-sided Student's t-tests and assuming groups of equal variances.



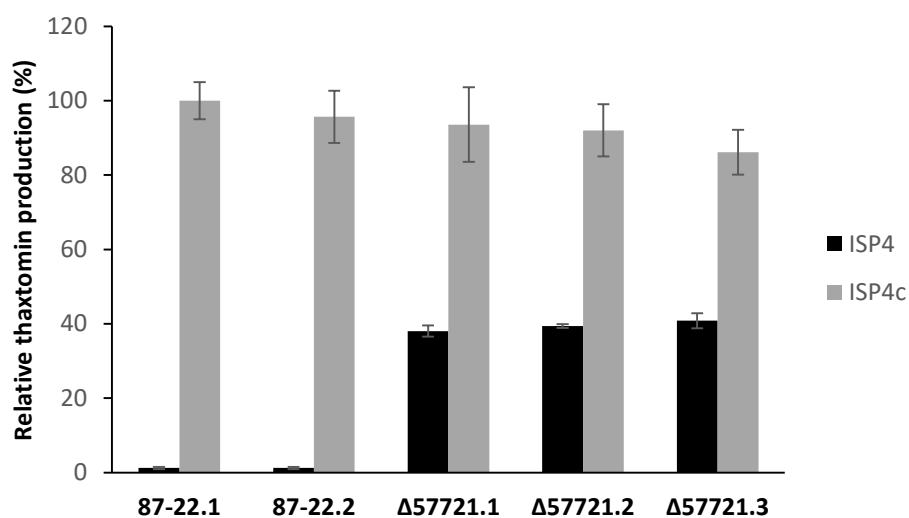
**Figure 70: Dynamics of cellobiose or cellotriose concentrations in the culture supernatants of *Streptomyces scabies* 87-22**

Mycelia grown in ISP2 medium for 24 hours were washed than resuspended in minimal media supplemented with 250  $\mu$ M cellobiose or cellotriose (time zero). The suspension was further incubated at 28°C with shaking for 11 hours. Both culture were periodically sampled and subjected to measurement of intracellular beta-glucosidase activity (black lines) and celooligosaccharides concentrations (red lines).



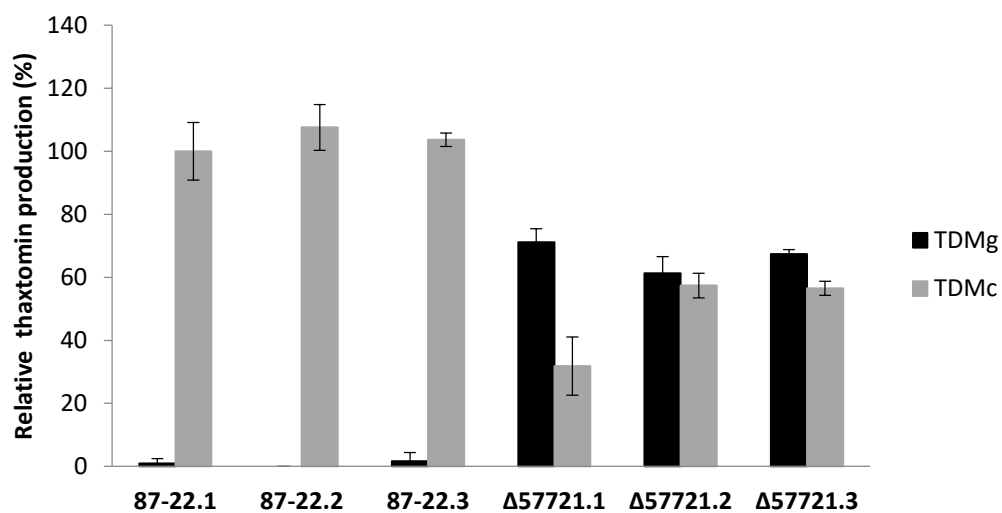
### 4.3.3 Induction of intracellular Beta-glucosidase activity of *S. scabies* correlates with extracellular cellobiose and cellotriose consumption

We previously brought the evidences that CebE binds to cellotriose and cellobiose with high affinity which suggested that the transport of these sugars could be the mechanism for the onset of thaxtomin production and thus of the pathogenicity of *S. scabies*. However, it remained to be demonstrated whether cellotriose would be directly imported by the CebEFG-MsiK ABC transport system or if instead it would be previously hydrolyzed into glucose and cellobiose in the extracellular environment which would in turn be taken up inside the cell. Such a scenario has been described for the chito-oligosaccharide ABC transporter DasABC-MsiK in *Streptomyces coelicolor*. Indeed, Saito and colleagues showed that even if the sugar-binding component DasA is able to bind *N-N'*-diacetylchitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub> and *N-N'-N''*-triacetylchitotriose (GlcNAc)<sub>3</sub> with high affinity, (GlcNAc)<sub>3</sub> is not directly transported but is first hydrolyzed outside the cell into (GlcNAc)<sub>2</sub> and N-acetylglucosamine (Saito et al. 2007). In an earlier study, SCAB57721 was reported as one of the proteins predominantly found in the extracellular fraction *S. scabies* wild-type strain 87-22 when grown on oat bran medium (Joshi et al., 2010). We thus investigated whether in *S. scabies* cellotriose is directly transported into the cell or if instead it is first hydrolyzed into glucose and cellobiose prior to import. *S. scabies* 87-22 grown for 24 hours in liquid ISP-2 medium was transferred to minimal media supplemented with either (Glc)<sub>2</sub> or (Glc)<sub>3</sub> as the sole carbon source. The concentration of cello-oligosaccharides remaining in the culture supernatant was measured by HPLC at one hour intervals post inoculation (hpi) (Figure 70). Analysis of the collected samples showed first a slow decrease of the sugar concentration from 0 to 3 hpi followed by a fast decrease between 3 and 7 hpi until total consumption of the carbon source. The absence of appearance of glucose and cellobiose combined with similar decreasing patterns of both cellobiose and cellotriose extracellular concentration suggest that under these conditions both carbohydrates are taken up at the same rate. We concomitantly evaluated the BG activity inside the cytoplasm and in the culture medium which revealed BG activity in total protein extracts while no activity was detected in the supernatant of the culture either containing cellobiose or cellotriose (Figure 70). Inside the cytoplasm, a basal BG activity was detected from 0 to 3 hpi which then started to increase from 3 to 7 hpi with both carbohydrates tested. The BG activity in the cellobiose-containing medium stopped to increase at 7 hpi and remained at its maximal level – though with a slight decrease – up to the end of the experiment (11 hpi). The increase of the BG activity in the cellotriose-containing media was further monitored up to 9 hpi and remained to its maximal level of activity up to 10 hpi before to slowly decrease at 11 hpi. The absence of extracellular BG activity together with no detection of glucose in the cellobiose-containing medium or glucose and cellobiose in cellotriose-containing medium suggests that no active cello-oligosaccharide hydrolase



**Figure 71: Thaxtomine A production by the  $\Delta bglC$  mutant of *S. scabies* on ISP4.**

Thaxtomine A production by the BglC mutant ( $\Delta 57721$ ) and the wild type strains of *S. scabies* (87-22) on ISP4 plates and ISP4 with cellobiose.



**Figure 72: Thaxtomine A production by the  $\Delta bglC$  mutant of *S. scabies* on TDM.**

Thaxtomine A production by the BglC mutants ( $\Delta 57721$ ) and the wild type strains of *S. scabies* (87-22) on TDM agar plates supplemented with glucose (TDMg) or cellobiose (TDMc) as only carbon source.

is secreted under these culture conditions. In agreement with these results, no signal peptide was detected in the N-terminal region of the BglC protein using SignalP 4.1, Signal-BLAST or PrediSi software suggesting that BglC has only an intracellular localization and thus intracellular activity. Consequently, the decrease of cellobiose and cellotriose in the media is most likely due to the transport of these sugars into the cytoplasm of *S. scabies*. We also observed that the decrease of the sugars in the culture medium correlates with the increase of intracellular BG activity. Since we know that BglC is expressed and produced in response to cellobiose it is rational to think that this enzyme contributes significantly to the BG activity measured in the total protein extract.

#### 4.3.4 Phenotype of the *bglC* mutant

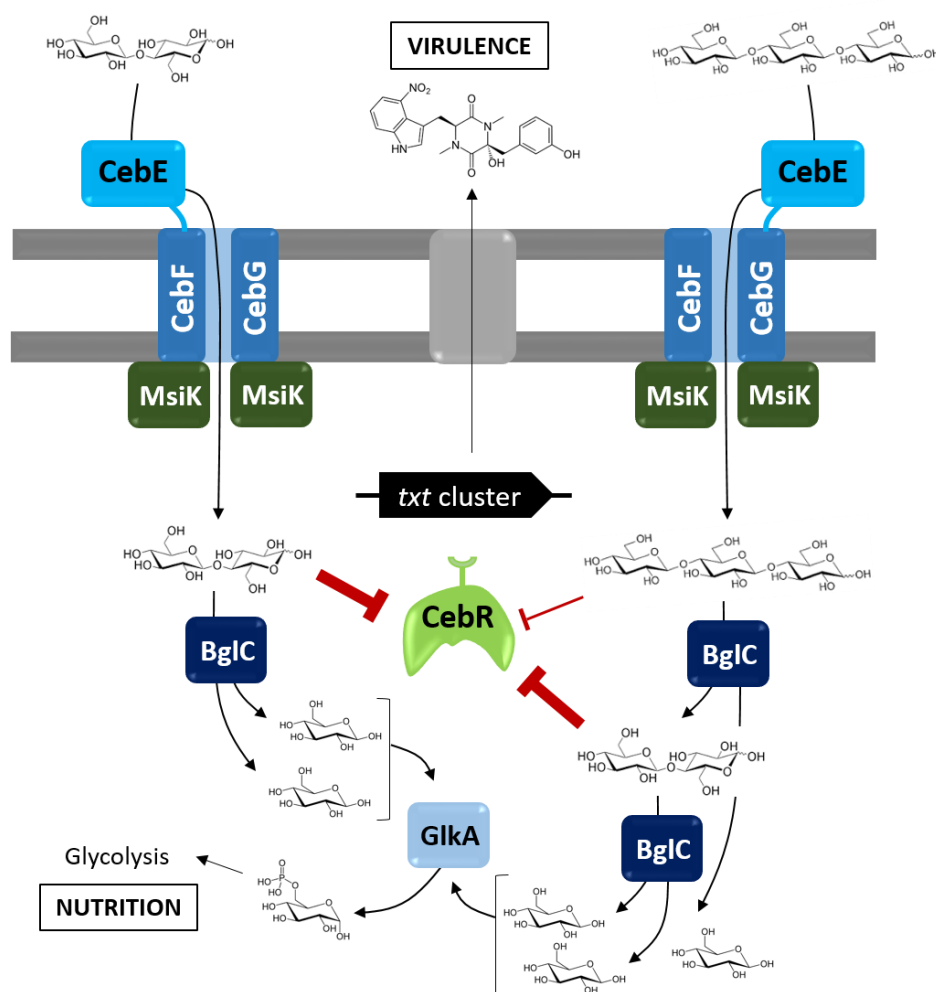
Since we demonstrated that *bglC*/BglC is i) induced by cello-oligosaccharides, ii) displays BG activity against (Glc)<sub>2</sub> and (Glc)<sub>3</sub>, and iii) that the BG activity of *S. scabies* is only intracellular, we finally assessed if the catabolic activity of BglC influences the onset of pathogenicity of *S. scabies*. We therefore generated a *bglC* null-mutant by replacing *scab57721* by the apramycin resistance cassette as performed previously for *cebE*, *cebR* and *msiK*. Semi-quantitative analysis by HPLC revealed that this mutant ( $\Delta bglC/\Delta 57721$ ) produces thaxtomin A constitutively (without cellobiose supply) in ISP4 (Figure 71) and TDMg (Figure 72), and overproduces it in OBB and OBA compared to the wild type strain (Dr. Isolde Francis, personal communication). The addition of cellobiose to ISP4 (Figure 71) and OBB/OBA (data not shown) is still able to increase the production of thaxtomin in the mutant which reaches the levels produced by the wild type grown under the same conditions. Contrariwise, in TDM with cellobiose as sole carbon source (TDMc), the  $\Delta bglC$  mutant produces approximately the same level of thaxtomin as in TDMg but can not reach the level of thaxtomin produced by the wild type in TDMc.

Surprisingly, as observed for the  $\Delta cebR$  mutant, the  $\Delta bglC$  mutant of *S. scabies* lost the cellobiose-dependent induction of thaxtomin compared to the wild-type strain. That this mutant is able to produce thaxtomin without the presence of the inducing molecules is currently difficult to explain based on the current model of the induction pathway of thaxtomin production.

#### 4.3.5 Discussion

At this stage we demonstrated that the protein encoded by the gene *scab57721* located downstream *cebEFG* operon is a  $\beta$ -glucosidase which expression is also controlled by CebR, the master regulator of pathogenicity in *S. scabies*. We also showed that this enzyme is able to cleave different cellooligosaccharides including the best inducers of thaxtomin production i.e., cellobiose and cellotriose. Since cellobiose and cellotriose consumption correlates with an intracellular increase of a beta-glucosidase activity, we suggest that activity of BglC (and any other enzyme with BG activity) plays an essential role in controlling the pool of imported elicitors to trigger the CebR regulon (Figure 73).

Cellotriose hydrolysis by BglC will generate cellobiose (the best allosteric effector of *cebR*) and glucose, while cellobiose hydrolysis will only generate glucose that will directly enter glycolysis through the action of the glucose kinase GlkA (Figure 73). The uptake of cellotriose would therefore result in a higher inhibition of the repression exerted by CebR compared to the uptake of cellobiose. Next to the higher affinity of CebE for cellotriose than cellobiose, this would further explain why cellotriose supply better induces thaxtomin production than cellobiose (Figure 73).



**Figure 73: Metabolic pathways from cellobiose and cellotriose transport to glycolysis and thaxtomin production.**

When cellobiose and cellotriose are transported into the cytoplasm through CebEFG-MsiK transporter, they both prevent the DNA binding ability of the regulator CebR (cellobiose much more efficiently than cellotriose) thus allowing expression of CebR-controlled genes including thaxtomin biosynthesis genes (*txt* cluster), *cebEFG* and *bglC*. Once expressed, BglC cleaves both cellobiose and cellotriose. While cellobiose hydrolysis directly leads to two glucose molecules, cellotriose hydrolysis generates first glucose and cellobiose which is the best allosteric effector of CebR and therefore further allows the expression of CebR-controlled genes. Glucose generated by the BglC activity is finally phosphorylated by the glucose kinase GlkA into glucose-6-phosphate which will be metabolized during glycolysis.

## 5 Industrial applications

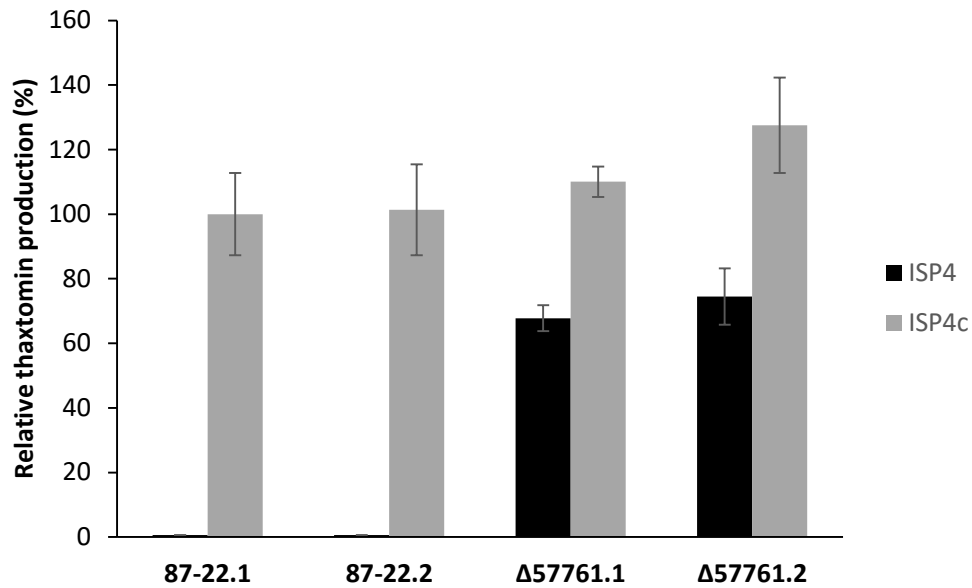
The results obtained in the course of this thesis extended well beyond the fundamental research scope of elucidating the mechanisms associated with the onset of virulence of *S. scabies*. Indeed, our researches on the CebR repressor of thaxtomin production and on the BglC beta-glucosidase have been found to propose solutions to current industrial applications. Two patent applications have been filled: i) *methods for thaxtomin production and modified Streptomyces with increased thaxtomin production* (WO2016/044527), and ii) *Use of a sugar tolerant  $\beta$ -glucosidase* (EP16158090). The preliminary results demonstrating the potential industrial applications of the *cebR* null mutant for economically viable industrial production of thaxtomin, and the use of pure BglC protein to improve the yield of glucose production from lignocellulosic biomass are described in this chapter.

### 5.1 Methods for thaxtomin production and modified *Streptomyces* with increased thaxtomin production

Our patent application describes the identification of CebR as master repressor of thaxtomin biosynthesis in *Streptomyces* species. We demonstrate how and why (the molecular mechanism) the inactivation of *cebR* results in the constitutive production of thaxtomin independently of cellobiose supply in the culture medium. The presence of *cebR*-binding sites associated with thaxtomin biosynthetic genes in other thaxtomin producing streptomycetes (except *Streptomyces ipomoeae*) allow us to claim that our method is applicable beyond the model species *S. scabies* 87-22.

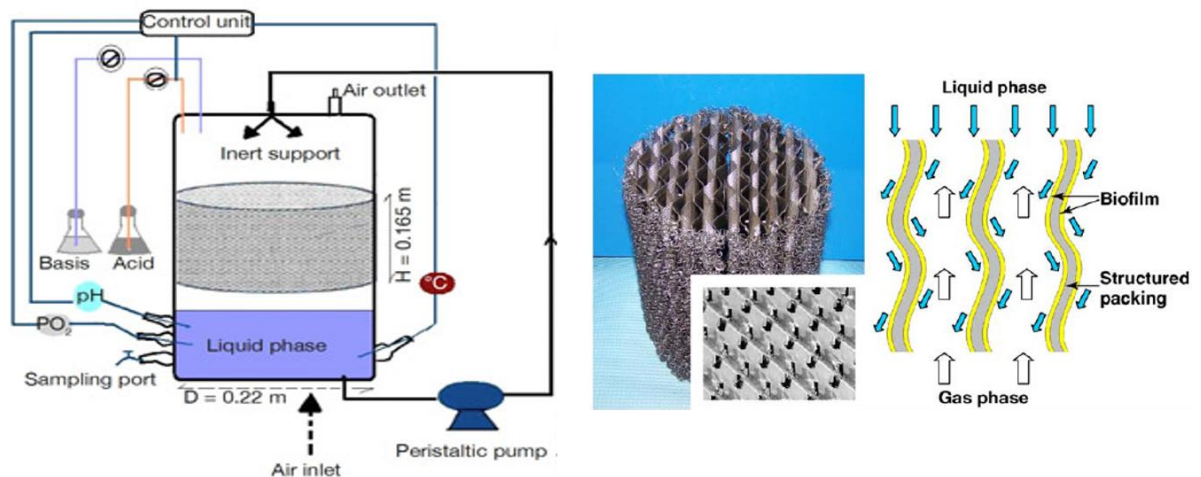
#### 5.1.1 Why to increase thaxtomin production?

As detailed in the introduction (see point 2.6.1.4), thaxtomin primarily targets the cell wall of dividing and expanding plant cells through an alteration of expression of cell wall biosynthesis-related genes and depletion of cellulose synthase complexes from the plasma membrane. This causes extensive cell wall remodeling characterized by a reduced incorporation of crystalline cellulose into the plant cell wall compensated by an increase amount of pectins and hemicelluloses (Scheible et al. 2003; Bischoff, Cookson, Wu & W. R. Scheible 2009). Thaxtomin provokes the same effects on plants, qualitatively as well as quantitatively, as the synthetic cellulose biosynthesis inhibitor isoxaben, making thaxtomin an excellent candidate as a natural herbicide (Bischoff, Cookson, Wu & W. R. Scheible 2009; Dayan & Duke 2014). In 2001, King and Lawrence reported a study in collaboration with James A. Gray from Dow Agrosiences, Inc. to evaluate the potential of thaxtomin for use as a commercial herbicide. The biological properties of this novel phytotoxin raised interest – notably by companies Marrone Bio Innovations, Inc. and Novozymes Biologicals, Inc. - and several patent applications worldwide have been filed for using thaxtomin as a



**Figure 74: Effect of the addition of cellobiose and/or the deletion of *cebR* on thaxtomin production by *S. scabies* 87-22.**

Thaxtomine A production by the CebR mutants ( $\Delta 57761$ ) and the wild type strains of *S. scabies* (87-22) on ISP4 agar plates with or without cellobiose 0.7 %.



**Figure 75: Scheme of a bioreactor used in biofilm fermentation.**

The liquid medium containing microorganisms is continuously spread on the top of the structured metallic support (right part of the figure). During the fermentation process all planktonic cells colonize the surface of the metallic support and start to grow as biofilm. The percolating medium provide nutrients and harvest secreted molecules along the fermentation process whereas oxygen is brought by a classical air inlet and diffuses easily across the biofilm (see scheme on the right). Each culture parameters from the liquid phase are easily followed and controlled (Rosche et al. 2009; Destain et al. 2015).

biological compound to control weeds (Leep et al. 2010; Kang et al. 2011; Inman & Shawn 2013; Koivunen et al. 2015).

Thaxtomin is a powerful weed-killer and it has the additional advantage of being biodegradable: soils already contain microorganisms that are able to use it as a nutrient source (Doubou et al. 1998; Lazarovits et al. 2004). Thaxtomin, as a biopesticide, offers an interesting alternative to chemically synthesized pesticides. Although several companies hold patents for the exploitation of this molecule, marketing thaxtomin is not economically viable as production costs are very high. A detailed consultation to companies supplying this molecule revealed that one milligramme currently costs between 218 and 590 Euros.

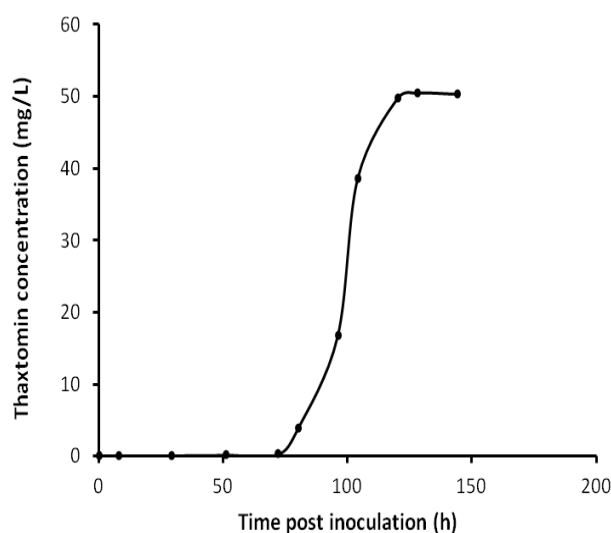
### 5.1.2 Deletion of *cebR* results in constitutive production of thaxtomin

As shown in the results section (point 4.1.2), the loss of CebR resulted in a drastic increase in thaxtomin production in OBA (an undefined complex medium known to contain cellobiose (Wach et al. 2007)) known to induce thaxtomin production, and on ISP-4 medium (containing soluble starch as sole carbon source) which is not known to induce production of the toxin in *S. scabies*. The later result demonstrates that we generated a mutant of *S. scabies* able to produce thaxtomin independently of the presence the elicitor cellobiose.

We also compared the thaxtomin production by the *cebR* mutant strains in the presence or absence of cellobiose. As shown in Figure 74, the addition of cellobiose in ISP4 media increase thaxtomin production by the mutant strains by 160-170 % compared to the condition without cellobiose. The further increase in toxin production by the mutant upon addition of cellobiose is most likely due to the function of cellobiose as ligand of the transcriptional activator TxtR, which drives the expression of the thaxtomin biosynthetic genes *txtA* and *txtB* (M. V. Joshi et al. 2007).

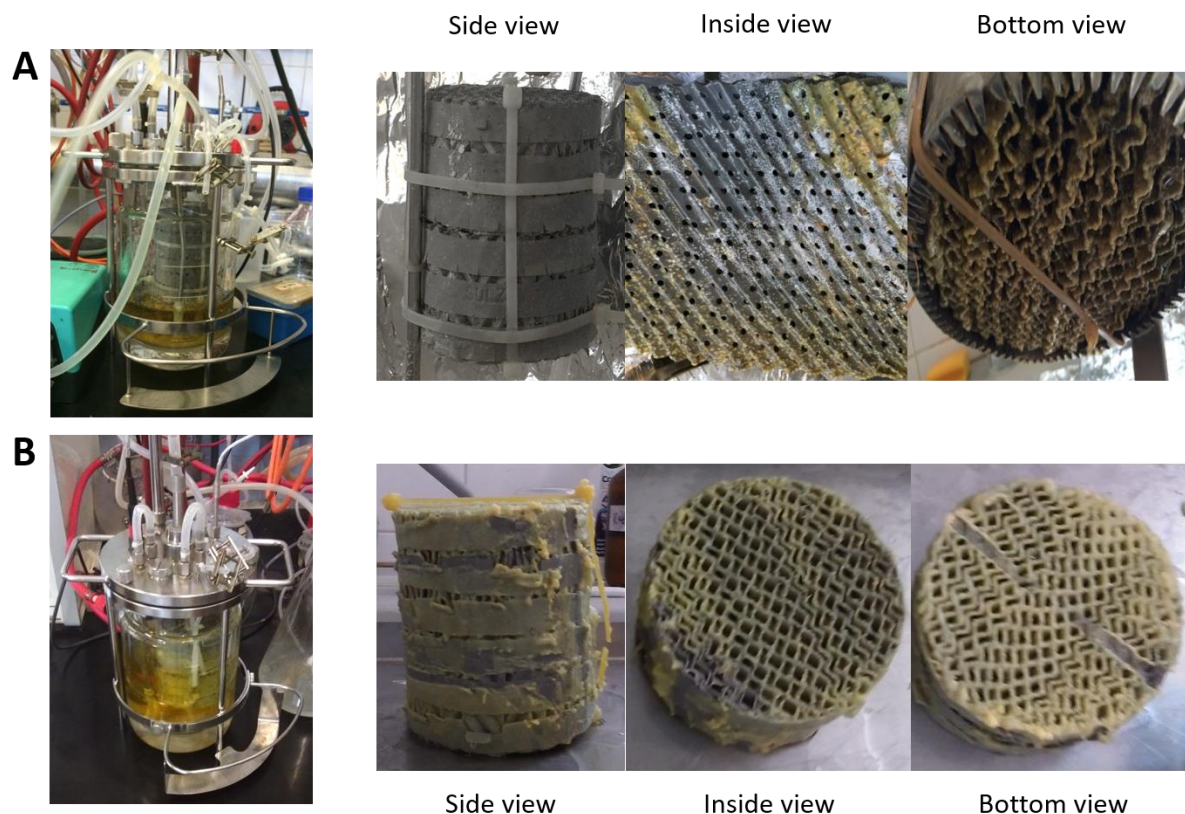
### 5.1.3 Thaxtomin production with the $\Delta$ *cebR* mutant at larger scale

Our first attempts to evaluate the yield of thaxtomin production by our mutant strain *S. scabies*  $\Delta$ *cebR* at a larger scale than in a laboratory flask or in petri dishes were carried out with two distinct fermentation processes. First, we tested batch fermentation in a classical Rushton turbine agitator which ensures a radial flow but causes high shearing that can damage filamentous bacteria as *Streptomyces*. Therefore, we also tested batch fermentation in a biofilm reactor which consists of a solid support in part or completely submerged in the liquid medium circulating continuously during the process (Figure 75). This promising technology has already been shown to combine the advantages of submerged fermentation in terms of process control and the advantages of solid-state fermentation in terms of biology and development for filamentous fungal species (Destain et al. 2015; Rosche et al. 2009). Since *Streptomyces scabies* is a filamentous bacteria producing extracellular matrix and



**Figure 76: Thaxtomin production by the *S. scabies*  $\Delta cebR$  mutant strain in Rushton turbine agitator.**

Batch fermentation in a 15 L fermentor with a Rushton turbine agitator were performed with 12L of ISP4 medium inoculated with pre-grown mycelium of *S. scabies*  $\Delta cebR$  mutant and incubated at 28°C for 150 hours. Thaxtomin concentration was measured by HPLC throughout the process.



**Figure 77: Thaxtomin production in 4 L biofilm reactors (left) and biofilm colonization of the metallic support (right) after the fermentation process.**

(A) The bottom of the metallic support was in part submerged and (B) completely submerged in the culture medium. Colonization of the solid support after fermentation can be appreciated on right pictures (yellow biomass). We observed that the metallic support was completely colonized in (B) whereas only few area (mainly the submerged bottom part) were colonized in (A). The yellowness of the culture medium is due to thaxtomin production by the  $\Delta cebR$  strain of *S. scabies* after 120 hours of incubation at 28°C.



naturally developing as a biofilm (Loria et al. 1997), biofilm fermentation is expected to be an appropriate approach for this microorganism.

#### 5.1.4 Thaxtomin production at larger scale

Batch fermentations with a Rushton turbine agitator were carried out in 15 L fermentors containing the ISP4 medium inoculated with *S. scabies*  $\Delta cebR$  mycelium (see M&M). Cultures were incubated at 28°C with a flow rate of sparged air fixed at 1 vvm<sup>13</sup> and an agitation rate of 250 rpm. Thaxtomin production was then measured by HPLC throughout the process and reported on the graph presented at Figure 76. We observed that phytotoxin production started between 50 and 70 hours post inoculation and the highest thaxtomin concentration (around 50 mg/L) was reached around 2 days later.

First attempts of thaxtomin production in a biofilm fermentor were carried out in collaboration with Prof. Frank Delvigne from Gembloux Agro-Bio Tech insitut (ULg). Two biofilm reactors containing ISP4 liquid media were inoculated with precultures of *S. scabies*  $\Delta cebR$  (see material and methods point 8.10 for details). In the first bioreactor, only a small part ( $\pm 10\%$ ) of the solid support was submerged into the medium (Figure 77A) whereas it was completely submerged in the second bioreactor (Figure 77B). After 48 hours of incubation at 28°C we observed that *S. scabies*  $\Delta cebR$  was able to grow on the solid support and started to produce thaxtomin in both conditions tested (Figure 77). It is interesting to note that the completely submerged support was fully colonized by bacteria while colonization was limited when the support was only partially submerged in the culture medium. Since solid support colonization by bacteria is a crucial event in this fermentation process, the completely submerged support approach is more appropriate for further investigations. Final thaxtomin concentrations measured in both conditions ( $\pm 30$  mg/L) can not be taken into account due to high water evaporation from the media occurring during the process. Contrariwise, as seen in Figure 77, a significant portion of the produced thaxtomin remained in the mycelium fixed on the support which suggests that the quantity produced under these condition could be underestimated.

Based on our first results, both type of fermentation process tested (classical with Rushton turbines agitators or in biofilm fermentor) allowed thaxtomin production by the mutant strain in a low-cost medium (ISP4) without addition of any expensive inducers (such as cellobiose). The highest thaxtomin concentration reached in these pre-industrial assays was obtained in a classical batch culture with Rushton turbines agitators. However it does not mean that this process have to be preferred. Indeed, biofilm fermentor remains a promising technology since it gather advantages of

---

<sup>13</sup> vvm = air volume/media volume/min

solid-state fermentation allowing development of microorganism which is correlated with secondary metabolite production and advantages of submerged fermentation in terms of process control.

Many improvements have to be performed on both type of processes as well as on genetics of the mutant strains or media composition to increase yields of thaxtomin produced. For example fed batch and continuous cultures have to be tested; preculture volume and media could still be optimized; the rare TTA codon in the coding sequence of the specific activator TxtR can be replaced by another leucin codon to allow earlier thaxtomin production; addition of precursors of thaxtomin (Trp and Phe) into the culture media is also an option.

### **5.1.5 Conclusion**

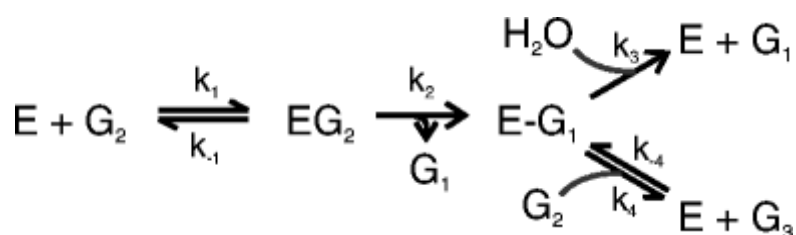
That we made thaxtomin exploitation possible at an industrial scale is a great step forward for the herbicide to become commercially viable. Our findings come right on time as glyphosate, the most used chemical herbicide notably commercialized by Monsanto under the trade name Roundup, has recently been predicted to be probably carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (Guyton et al. 2015). Investigations on the toxicity of thaxtomin still have to be performed. However, as thaxtomin is naturally produced in the soil, plants and animal species have learned to live with this biomolecule and, importantly, the microorganisms neighboring *S. scabies* had hundreds of millions of years to exactly know how to degrade this compound (Doubou et al. 1998; Lazarovits et al. 2004). However, we have to keep in mind that thaxtomin concentrations that could be used in case of industrial exploitation of this bioherbicide could yet be noxious for environment.

## 5.2 Use of a sugar tolerant $\beta$ -glucosidases

### 5.2.1 Introduction

Currently, the utilization of lignocellulosic biomass to produce monomer sugars that can be further fermented in ethanol or transformed in other high added-value molecules presents significant environmental, technical and economic challenges (Anon 2015). Its success will largely depend on the development of potent biocatalysts for degradation of pretreated lignocellulosic biomass. Indeed, since enzyme costs may contribute up to 50 % of the total cost associated with lignocellulose hydrolysis, it is of great interest to find efficient and cost-effective enzymes working in synergism under conditions of defined processes. (Singhania et al. 2013; Sørensen et al. 2013; Klein-Marcuschamer et al. 2012; Johnson 2016; Saritha Mohanram 2015; Souza et al. 2013). Lignocellulosic biomass pretreatment is also an expensive step and is a prerequisite for efficient enzyme-mediated degradation. Indeed, cellulose fibrils are embedded in an amorphous matrix of lignin, pectins and hemicelluloses that must be destructured and degraded to increase the accessibility of these polymers to enzymes involved in their hydrolysis (Saritha Mohanram 2015). Classical pretreatment methods include acid, base or organic solvents pretreatment, steam- or CO<sub>2</sub> explosion, as well as wet-oxidation (Alvira et al. 2010; Maurya et al. 2015).

In this chapter we will focus on enzymes involved in cellulose hydrolysis and more specifically on beta-glucosidases (BGs). Indeed, since cellulose is the main component and therefore the main glucose source of lignocellulosic biomass, its effective hydrolysis is of particular interest. After pretreatment, degradation of cellulose from lignocellulosic biomass classically involves sequential and synergistic actions of three main categories of glycosylhydrolases, namely endoglucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.74, EC 3.2.1.176) and beta-glucosidases (EC 3.2.1.21). Endoglucanases rapidly decrease the degree of polymerization of lignocellulosic biomass substrate by randomly hydrolyzing the internal 1,4-beta-linkages of cellulose. Cellobiohydrolases further hydrolyze the cellulose polymer from the free ends, thereby releasing mainly cellobiose that is finally degraded into glucose by beta-glucosidases (M. Wang et al. 2013; Sørensen et al. 2013). Note that lytic polysaccharide monooxygenases (AA 10 family) and expansin-like proteins can also be used to increase accessibility of cellulose chains from its crystalline form to glycosylhydrolases (Corrêa et al. 2015; Liu et al. 2015).



**Figure 78: Schematic representation of the  $\beta$ -glucosidase-catalyzed turnover of a substrate.**

Substrate (cellobiose or *p*-NP $\beta$ G) ( $\text{G}_2$ ) binds to the enzyme to form a Michaelis complex ( $\text{EG}_2$ ) that reacts to form a first product ( $\text{G}_1$ ) ( $\text{G}_1$  = glucose if cellobiose is the substrate or  $\text{G}_1$  = para-nitrophenol if *p*-NP $\beta$ G is the substrate) and a covalent glucosyl-enzyme intermediate ( $\text{E-G}_1$ ). The latter can react with water to produce glucose (hydrolysis) or with another hydroxyl-donor molecule such as (cellobiose, glucose, ethanol,...) ( $\text{G}_2$ ) to produce a new glucose-containing molecule ( $\text{G}_3$ ) as a second product (transglycosylation). In the case of such model substrates as *p*-NP $\beta$ G, the chromophore is released as the first product (Teugjas & Våljamäe 2013b).

### 5.2.2 $\beta$ -glucosidase: a key component of cellulose hydrolysis

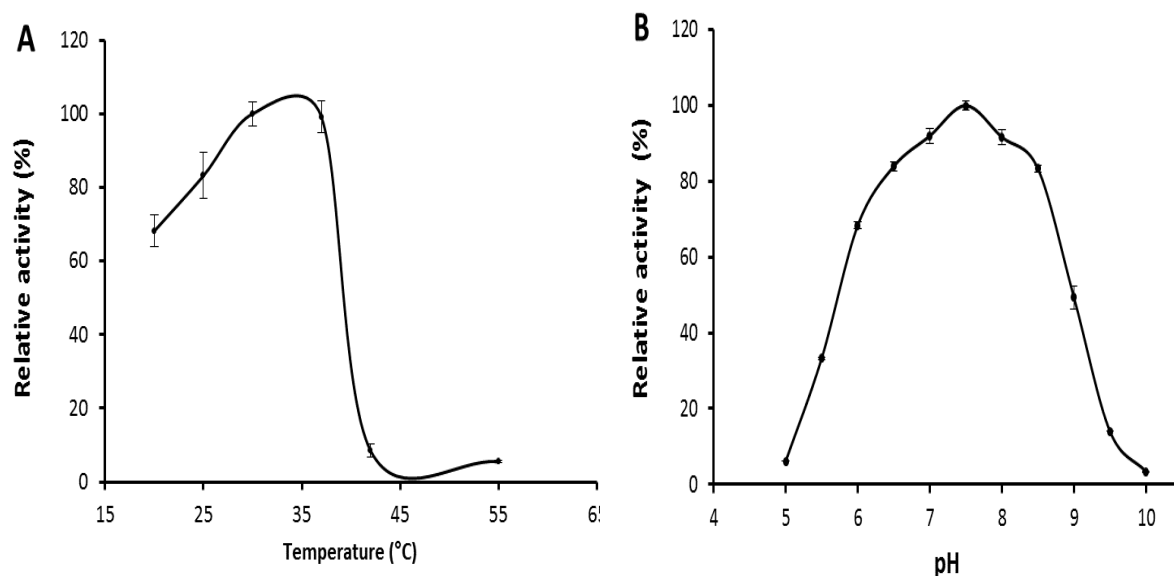
It has been shown that cellobiohydrolases and endoglucanases are often inhibited by cellobiose (Murphy et al. 2013; Teugjas & Våljamäe 2013a; Gruno et al. 2004). By reducing the accumulation of cellobiose, BGs thus play a key role and can be considered as the rate-limiting enzyme of the cellulose hydrolysis process (Singhania et al. 2013; Sørensen et al. 2013; Saritha Mohanram 2015).

In addition, BG are also subjected to inhibition by different compounds encountered during the saccharification process. Indeed, lignocellulosic biomass hydrolysis into simple sugars and their further fermentation in ethanol can be conducted in different vessels, or simultaneously in a process called simultaneous saccharification and fermentation (SSF). In the first case accumulation of sugars such as glucose, mannose, xylose or galactose released during saccharification of the lignocellulose biomass are known to inhibit BGs and therefore subsequently decreases the overall rate of hydrolysis (Qing et al. 2010; Xiao et al. 2004). Therefore SSF is usually preferred due to its lower cost and lower sugar inhibitory effects<sup>14</sup>. However, there are still several drawbacks in SSF processes, such as different optimal temperatures of saccharification and fermentation as well as cellulases inhibition by ethanol (Bezerra & Dias 2005; Podkaminer et al. 2011; Meleiro et al. 2015).

Another frequently reported unwanted event in lignocellulosic biomass hydrolysis is due to the transglycosylation activity of some BGs (Bohlin et al. 2013). Indeed, when the  $\beta$ -1,4-linkage of the substrate is cleaved by a BG, the covalent glucosyl intermediate formed has to be attacked by an hydroxyl-containing molecule to recover the initial state of the enzyme (Figure 78). Transglycosylation happens when this hydroxyl-containing molecule is not water (with water it is a classical hydrolysis) such as sugars or alcohols which leads to the synthesis of newly formed oligosaccharides or glucose-derivative molecules. The transglycosylation activity of a BG competes with its hydrolysis activity, thereby decreasing the overall rate of the glucose released. Since cellobiose, glucose and ethanol accumulate to reach relatively high concentrations during the process they often participate to and promote transglycosylation events by some BGs. Transglycosylation involving substrates as hydroxyl-containing molecules is one of the most common transglycosylation event leading to substrate inhibition of BGs (Teugjas & Våljamäe 2013b). Hence, the use of BGs highly tolerant toward sugars and ethanol inhibition and having at the same time a limited transglycosylation activity is of great importance for an efficient and cost effective conversion of cellulose from pretreated lignocellulosic biomass to fermentable sugars (Singhania et al. 2013; Saritha Mohanram 2015). Moreover a  $\beta$ -glucosidase with these properties can also advantageously be used in other processes such as

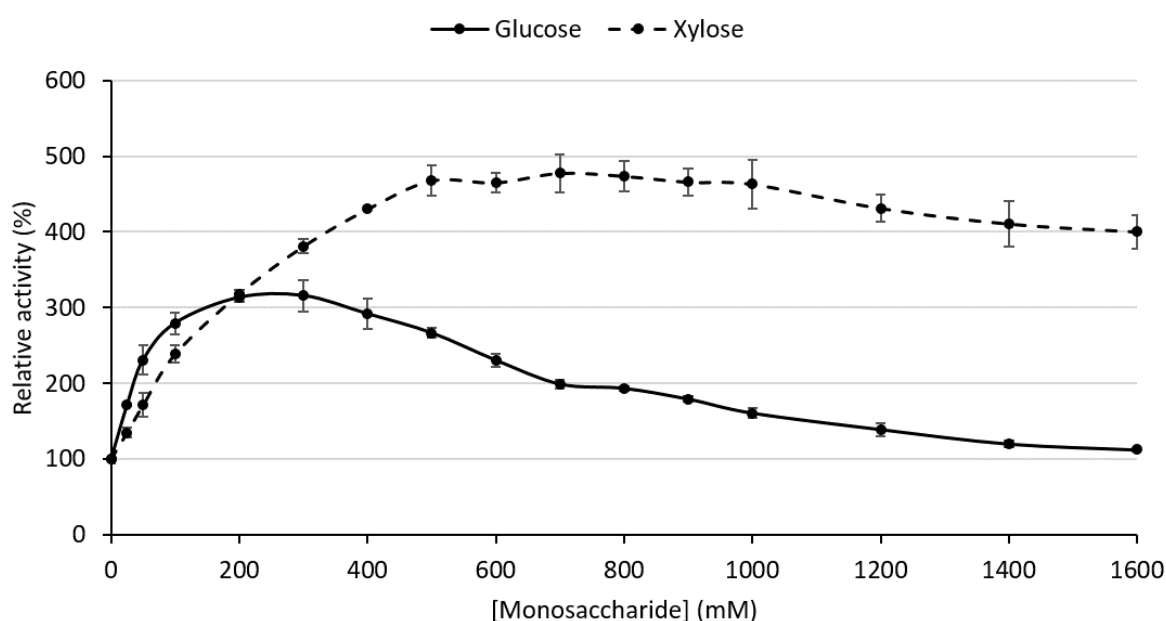
---

<sup>14</sup> However, a relatively high glucose concentration is needed to keep a good ethanol production yield by microorganisms.



**Figure 79: Effect of temperature and pH on BglC activity.**

The optimal temperature was determined by measuring the relative enzyme activity of BglC (0.2  $\mu$ M) in HEPES 50 mM pH 7.5 at 20, 25, 30, 37 and 42 °C. To measure the effect of pH, the relative activity of BglC was assessed in the range of pH 5.0 – 6.5 (50 mM MES buffer), pH 7.0 – 8.5 (50 mM HEPES buffer), and pH 9 – 10 (50 mM CHES buffer) at 25°C. See methods sections for details.



**Figure 80: Effect of D-glucose, and D-xylose on BglC activity.**

Relative activity of the purified BglC on hydrolysis of *p*-NP $\beta$ G in presence of various concentration of D-glucose and D-xylose. The activity measured without any additive was fixed to 100% (Control).

those required to improve the organoleptic properties of plant-derived products. Indeed, some  $\beta$ -glucosidases can catalyze the hydrolysis of a number of different substrates containing a  $\beta$ -1,4 linked glucose residue. For instance, these enzymes can be used to liberate aroma through the hydrolysis of the glucoside precursors, especially monoterpenyl  $\beta$ -D-glucosides found in plant-derived beverages or food, such as wine or fruit juices (Baffi et al. 2013; Maicas & Mateo 2005; Saritha Mohanram 2015).

### **5.2.3 Characterization of the $\beta$ -glucosidase BglC from *Streptomyces scabies***

In this section we will present some results obtained from experiments carried out to assess the properties of BglC such as temperature/pH optima and tolerance toward inhibitors in order to determine if BglC from *S. scabies* could be a candidate enzyme for cellulose-based processes. All following experiments were performed with chromogenic substrat and results were interpreted as usually reported in literature. However, a recent publication combined to preliminary experiments suggest that this standard approach to characterize, classify or select glucose tolerant BGs is controversial and is likely to conduct to the identification of false 'good candidate' enzymes. The problematic aspects associated with the generally used protocol will be discussed at the end of this section (point 5.2.4).

#### **5.2.3.1 Optimal pH and temperature**

The differents lignocellulosic biomass hydrolysis processes require specifics set-ups such as temperature and/or pH variations depending on the different steps needed and the microorganisms/enzymes used throughout each process. For example, in SSF processes in which hydrolysis into simple sugars and their further fermentation in ethanol are conducted simultaneously, hydrolytic enzymes have to work at pH and temperature compatibles with ethanol-producing yeasts.

Therefore, the activity of BglC at different temperatures (from 20 to 55°C) and pH (from 5 to 10) values was measured using *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-NP $\beta$ G) as substrate. The activity of the enzyme gradually increased from 20 to 30°C and displays a similar activity up to 37°C (Figure 79A). The activity abruptly declines to 10% of its maximal activity at 42°C (Figure 79A). The optimal pH of BglC is around 7.5 and the enzyme conserved high activity when the pH is between 6.5 and 8.5 (Figure 79B). The activity rapidly decline to 30 and 50% of its optimum at pH 5.5 and 9, respectively (Figure 79B). These results suggest that to exhibit its best activity BglC has to be used in hydrolytic processes in which temperature and pH range from 30 to 37°C and from 6.5 to 8.5, respectively.

#### **5.2.3.2 Effects of sugars on BglC activity**

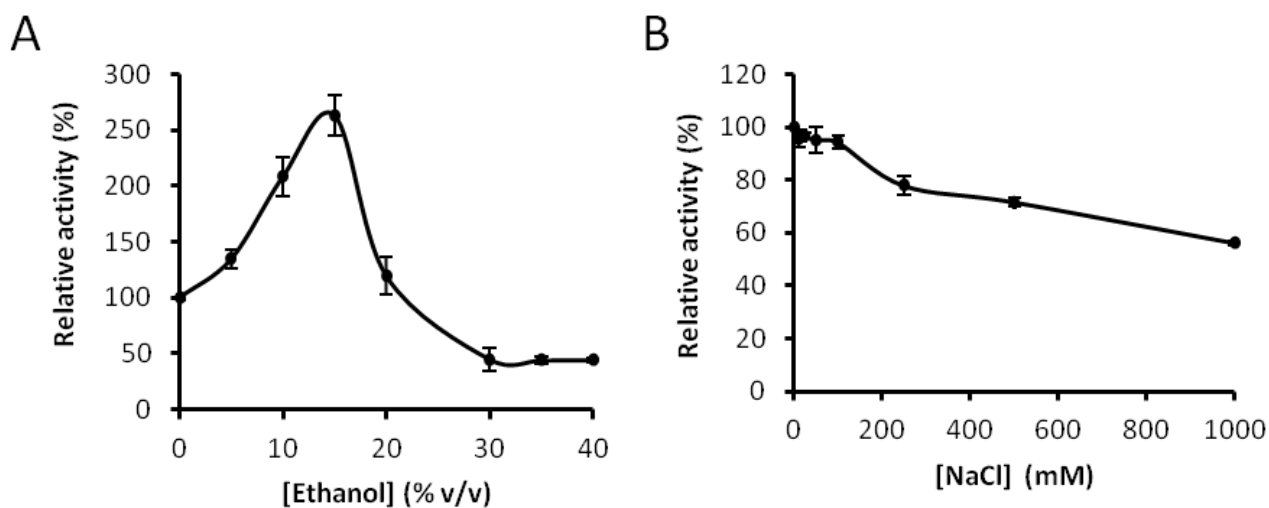
The activity of recombinant BglC was measured in the presence of glucose to assess whether the accumulation of the product could inhibit or activate its hydrolytic activity using *p*-NP $\beta$ G as substrate. The effect of xylose on BglC activity was also assessed as this sugar, emanating

Oses (15 % w/v)	Relative initial rate of hydrolysis (%)
Control	100 ± 6
Fructose	178 ± 9
Glucose	206 ± 13
Xylose	340 ± 20
Galactose	255 ± 9
Mannose	119 ± 3
Arabinose	62 ± 1
Sorbitol	202 ± 1

Reagents	Relative initial rate of hydrolysis (%)
Control	100 ± 2
DTT 10mM	116 ± 5
EDTA 10mM	98 ± 15
SDS 10mM	64 ± 3
Urea 10mM	103 ± 13
Ethanol 10%	218 ± 6
Methanol 10%	65 ± 6

**Table 3 : Effect of various oses/reagents on BglC activity.**

The BglC activity was measured with *p*-NPβG as substrate. The relative activity measured without any additive was fixed to 100% (Control).



**Figure 81: Effect of ethanol or NaCl on BglC activity.**

Relative activity of the purified BglC on hydrolysis of *p*-NPβG in presence of various concentration of ethanol (**A**) or NaCl (**B**). The relative activity measured without any additive was fixed to 100% (Control).



from hemicellulose hydrolysis, is likely to accumulate in processes involved in lignocellulose hydrolytic degradation. Both glucose and xylose revealed to highly enhance the activity of BglC (Figure 80). In these conditions (*p*-NPβG 1 mM, BglC 0.2 μM), the activity of BglC increased to around 250-300% when the total concentration of glucose in the assay was ranging from 100 to 700 mM and conserved 100% of its activity at least up to 1.6 M glucose. The addition of xylose improved even better the activity of BglC than glucose, with the maximal activity of 300-350% measured when the total concentration of xylose was ranging between 0.3 to 1.6 M. BglC from *S. scabies* is thus not only glucose- and xylose-tolerant but highly stimulated by these sugars.

In addition, the effect of other sugars on the activity of BglC was further tested (Table 3). Arabinose was the only sugar tested which strongly inhibited the activity of BglC. Mannose has a moderate effect, and fructose and sorbitol both displayed a similar enhancing effect as observed for glucose. The effect of galactose was intermediate between those observed for glucose and xylose, the latter being the best sugar for enhancing the activity of BglC toward *p*-NPβG, under the conditions tested.

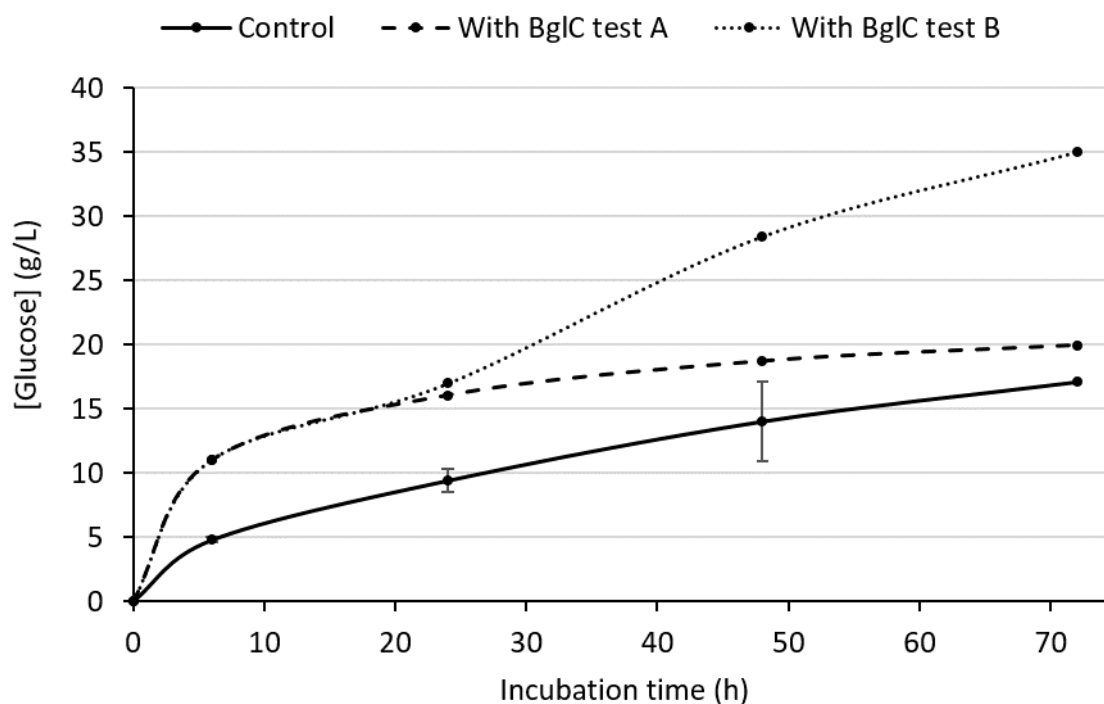
#### **5.2.3.3 Effect of different reagents on BglC activity**

The effect of several reagents on the activity of BglC under optimal conditions (pH and T°) are shown in Table 3. Importantly, ethanol, the final product of the complete enzymatic hydrolysis of cellulose and the subsequent fermentation of glucose, revealed to further enhance the activity of the enzyme. This results was confirmed in assays with various concentrations of ethanol ranging from 0 to 40 %v/v, with a maximal activity detected at 15 % v/v (Figure 81A).

The activity of BglC measured in the presence of 0 to 1 M of NaCl reveals that NaCl does not significantly alter the capacity of the enzyme to hydrolyze *p*-NPβG below 100 mM, and that around 70% of the activity is conserved at 500 mM (Figure 81B). A concentration of 1 M of NaCl was necessary to reduce the activity of BglC to about 50% (Figure 81B).

#### **5.2.3.4 BglC increases glucose production yield when added in a commercialized cellulolytic enzymes mixture**

To determine the efficiency of BglC in conditions more closely related to industrial processes of lignocellulosic biomass hydrolysis, we evaluated the effect of our beta-glucosidase on glucose production yield once added to commercialized enzymes mixture kits. Two commercialized enzyme mixtures named DELTAGAS® AT-150 and DELTAZYM® AT-150 from WeissBioTech GmbH company were tested. Both mixtures are aimed to hydrolyse the lignocellulosic biomass at a temperature ranging from 38 to 42 °C. Nevertheless, DELTAZYM® AT-150 is designed to work under acidic conditions (pH 4.3 to 4.7) whereas DELTAGAS® AT-150 is designed to work under neutral pH conditions (pH 7.3 to 7.7).



**Figure 82: Effect of addition of BglC on cellulose hydrolysis by DELTAGAS® AT-150 enzymes mixture.** 10 % Avicel solution containing the DELTAGAS® AT-150 enzymes mixture supplied (dotted lines) or not (plain line) with 5  $\mu$ M of pure BglC were incubated at 38°C on a rotary shaker. Glucose concentrations were measured after 6, 24, 48 and 72 hours of incubation. Results obtained from duplicated assays with BglC are shown separately since they showed significant differences after 48 and 72 hours of incubation.

Experiments were performed with DELTAGAS® AT-150 and DELTAZYM® AT-150 as recommended by the supplier in a 10 % microcrystallin cellulose (Avicel pH101) solution buffered at pH 7.5 and 4.5, respectively (see material and methods point 8.4.3.6). When added, BglC was at a final concentration of 5  $\mu$ M. Two samples for each condition were incubated on a rotary shaker at 38°C for 72 hours. Glucose concentrations were measured after 6, 24, 48 and 72 hours of incubation. As expected, glucose production yields of samples treated with DELTAZYM® AT-150 were identical with or without BglC supply as the enzyme is inactive at pH 4.5 (data not show and see Figure 79). Contrariwise, after 6 and 24 hours of incubation with DELTAGAS® AT-150 we observed that BglC improved the glucose production yield twice as much compared to the control condition in both samples (Figure 82). Oddly, after 48 and 72 hours of incubation we noticed a huge difference in glucose production yield between the two replicates containing BglC (see test A and B Figure 82). Indeed, the glucose concentration in sample A just increased slightly (48h) or not at all (72h) compared to the concentration measured in the control sample. Instead, in sample B the addition of BglC caused further increased glucose production at these latter collection time points.

These results support the hypothesis that BglC could greatly enhance the glucose production yield by the DELTAGAS® AT-150 enzyme mixture during the first 24 hours of cellulose hydrolysis. However, further investigations are necessary to find proper conditions in which BglC would exhibit its activity over a longer period.

#### **5.2.3.5 Conclusions and discussion**

As presented before, we confirmed that BglC isolated from *S. scabies* exhibits a BG activity against *p*-NP $\beta$ G, cellobiose and other celooligosaccharides. The first enzyme parameters assessed were the optimal pH and temperature at which BglC displays its BG activity. BglC exhibits an optimum temperature between 30°C and 37°C and an optimum pH about 7.5 which is unusual compared to others sugar tolerant beta-glucosidases. Indeed, most of these enzymes were isolated from fungi and exhibits their best activities at high temperature and low pH since these conditions are more commonly found in lignocellulosic saccharification processes (Table 4). However, other processes involve microorganism/enzyme living/working at lower temperature and/or neutral pH. For example, the optimal temperature for ethanol-producing yeasts used in SSF processes is 35°C which is not convenient for the classically used cellulases. Moreover, we have shown that increasing the concentration of ethanol (up to about 20 % v/v) enhances the activity of BglC and that the enzyme keeps 50 % of its activity at least until 40 % v/v. These characteristics make BglC a candidate of great interest in such processes. Kinetics parameters are also often used to select the best BGs to be used in lignocellulosic biomass hydrolysis (Teugjas & Våljamäe 2013b). Indeed, since cellobiohydrolases (CBH) are inhibited at few millimolar range of

## A : Glucose tolerant BGs

Organism	t (°C)	pH	$k_{cat}^*$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m^*$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{i\text{ glucose}}$ (mM)	xylose effect	Ethanol effect	Transglyc. activity	References
<i>Trichoderma reesei</i> (CelA1)	40	6	-	-	-	50	-	-	Yes	(Jeng et al. 2011)
<i>Torulopsis wickerhamii</i>	50	4.2	-	300	-	190	Not inhibited (no value)	-	-	(Himmel et al. 1986)
<i>Trichoderma harzianum</i>	40	6	9.2	1.22	0.075	IC50 = 300	-	-	-	(Santos et al. 2016)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	95	5	454	20	0.23	300	-	-	-	(Kengen et al. 1993)
<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	40	5	141	57.9	0.02	439	-	Inhibited at 15 %v/v	-	(Belancic et al. 2003)
<i>Aspergillus niger</i>	40	4	4.3	-	-	543	-	IC50 > 40 %v/v	-	(Yan & Lin 1997)
<i>Aspergillus unguis</i>	60	6	0.49	4.85	0.001	800	-	ND	-	(Rajasree et al. 2013)
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	5	253	7	0.36	1360	-	activated up to 20 %v/v than inhibited	-	(Riou et al. 1998)
<i>Candida peltata</i>	50	5	54	66	0.01	1400	IC50 > 56 mM	activated up to 0,75 %v/v than strongly inhibited	-	(Saha & Bothast 1996)
Uncultured bacterium	40	6-7	-	-	-	4280	-	-	-	(Li et al. 2012)

## B: Glucose tolerant and stimulated BGs

Organism	t (°C)	pH	$k_{cat}^*$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m^*$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	IC50 glucose (mM)	IC50 xylose (mM)	Ethanol effect	Transglyc. activity	References
<i>Scytalidium thermophilum</i>	60	6.5	2.5	1.61	0.015	> 200	> 200	-	Yes	(Zanoelo et al. 2004)
<i>Humicola insolens</i> (HiBGL)	60	6	78.8	0.51	1.5	> 450	> 730	-	-	(Souza et al. 2010; Souza et al. 2013)
<i>Streptomyces</i> sp. (ATCC 11238)	50	6				> 500	-	-	Yes	(Pérez-Pons et al. 1995)
<i>Penicillium funiculosum</i> NCL1	60	5	4.51	1.25	0.036	> 550	-	-	-	(Ramani et al. 2015)
<i>Thermoanaer. thermosacch.</i>	70	6.4	104	7.9	0.13	600	-	-	-	(Pei et al. 2012)

cellobiose (Gruno et al. 2004; Murphy et al. 2013; Park et al. 2012; Jalak et al. 2012) it is crucial to find BG having high affinity toward cellobiose (low  $K_m$ ) which means that these enzymes will reach their maximum velocity at cellobiose concentrations that do not inhibit the CBH activity. However, most known BGs have  $K_m$  values in the same order of magnitude than the cellobiose concentrations that inhibit CBHs (Teugjas & Väljamäe 2013b). BglC of *S. scabies* has instead a low  $K_m$  (0.77 mM) but a low turnover ( $k_{cat} = 6.7 \text{ s}^{-1}$ ). Since both  $K_m$  and  $k_{cat}$  have an effect on catalytic efficiency of the enzyme, specificity constant value ( $k_{cat}/K_m$ ) is used to compare candidates BGs (Table 4) (Teugjas & Väljamäe 2013b). Taken alone, the specificity constant value of BglC for cellobiose ranks it among the worst beta-glucosidases reported in the literature in terms of catalytic efficiency due to its low  $k_{cat}$  value (Table 4 and (Teugjas & Väljamäe 2013b)). However, as already mentioned, BGs are often inhibited by glucose which leads to cellobiose accumulation and therefore CBH inhibition. Therefore, the glucose inhibition parameters  $K_i$  or  $IC_{50}$  have also to be taken into account for the selection of optimal BGs (see Table 4) (Teugjas & Väljamäe 2013b). Interestingly we found that BglC is activated by glucose (when *p*-NPβG is used as substrate) and that the enzyme keeps at least 80 % of its activity at a concentration of 2 M of glucose which thus prevents the exact determination of the  $IC_{50}$  concentration. Noteworthy, Teugjas et al who studied kinetic parameters of BG to select the best candidates for the cellulose saccharification process, suggest that *“although a high specificity constant (of a BG toward cellobiose) is always an advantage, the priority may be given to a higher tolerance to glucose inhibition when performing separate hydrolysis and fermentation”* (Teugjas & Väljamäe 2013b). We can add that this statement is true for all cellulose hydrolysis processes generating high glucose concentrations. Indeed, a concrete example is provided by a study of Cao et al. in which a BG highly tolerant to /activated by glucose but having poor specificity constant value ( $k_{cat}/K_m = 0.02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Table 4), considerably improved the hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse (up to 36 %) when added to the commercialized enzyme mixture (Cao et al. 2015). From this point of view, BglC thus appears as a really good candidate for cellulose hydrolysis in such conditions. Indeed, even if few beta-glucosidases have already been reported to be tolerant and/or stimulated by glucose, some of them seem inhibited at higher concentrations. Only few recently characterized BGs are likely able to reach such a glucose tolerance (Meleiro et al. 2015; Uchiyama et al. 2015; Cao et al. 2015; Biver et al. 2014; Uchiyama et al. 2013; Xu et al. 2011; Lu et al. 2013). We also found that BglC is not only activated by glucose but is also by almost all the tested sugars. It is greatly activated by xylose as already reported for others glucose stimulated BGs such as HIBGL (Souza et al. 2010; Souza et al. 2013; Souza et al. 2014), Unbgl1A (Lu et al. 2013), GH1-1 (Meleiro et al. 2015), Td2F2 (Uchiyama et al. 2013), Bhbgl (Xu et al. 2011) and others (Zanoelo et al. 2004; Nascimento et al. 2010). The enzyme is also activated by fructose, galactose, mannose and sorbitol. BglC from *S. scabies* thus shares similar sugar resistance properties with the best sugar-stimulated BGs reported so far, but it stands out from many of these enzymes based on its

Organism	t (°C)	pH	k <sub>cat</sub> * (s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> * (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	IC50 glucose (mM)	IC50 xylose (mM)	Ethanol effect	Transglyc. activity	References
<i>Humicola grisea</i>	50	6	27.3	0.27	1	> 600	> 600	-	-	(Nascimento et al. 2010)
<i>Humicola insolens</i> RP86 (rHiBGL)	60	5-7	171	0.38	4.5	800	> 1000	-	-	(Souza et al. 2014)
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	60	6	649	25.5	0.25	> 800	-	-	-	(F. Yang et al. 2015)
<i>Neurospora crassa</i>	42	6	47	0.21	2.24	> 950	> 910	-	Not detected	(Meleiro et al. 2015)
Uncultured bacterium	40	6.5	13.2	20.4	0.01	1000	-	-	-	(Fang et al. 2010)
<i>Neotermes koshunensis</i> (termites)	50	5	nd	nd	nd	> 1000	-	-	Yes	(Uchima et al. 2011)
Microbial metagenome (Td2F2)	75	5.5	7.13	4.44	0.016	> 1000	> 1000	activated up to 10 %v/v than inhibited at 25 %v/v	Yes (very high)	(Uchiyama et al. 2013)
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	50	7	-	-	-	> 1000	> 900	-	-	(Xu et al. 2011)
Kusaya gravy metagenome	50	5.5	138	0.358	3.86	> 1000	-	Tolerant up to 10% (IC50 = 25%v/v)	Not detected	(Uchiyama et al. 2015)
Soil metagenome	50	6	-	-	-	>1500	> 130	-	Yes	(Lu et al. 2013)
<i>Streptomyces scabies</i> (BglC)	30-37	7.5	6.7	0.77	0.09	> 1600	> 1600 <sup>§</sup>	activated up to 20 %v/v IC50 = 40 %v/v	-	<b>This thesis</b>
Metagenome (AS-Esc10)	60	8	2	16.9	0.12	> 2500	-	-	-	(Biver et al. 2014)
Metagenome (M3 mutant)	60	5.5	83	49.2	0.02	3000	-	-	Not detected	(Cao et al. 2015)

\*Only Kinetic parameters (k<sub>cat</sub> and K<sub>m</sub>) determined with cellobiose as substrate are reported in this table. k<sub>cat</sub> values were calculated from the reported specific activity and molecular weight of the enzyme.

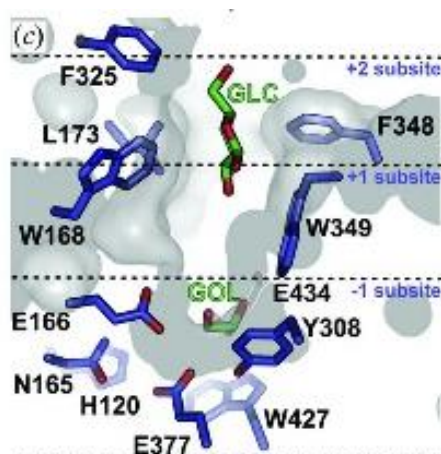
**Table 4: Parameters of (A) glucose tolerant and (B) glucose tolerant and stimulated BGs.**

BGs are listed in the order of increasing K<sub>i</sub><sub>glucose</sub> or IC50<sub>glucose</sub> values determined with *p*-NPβG as substrat. IC50 values reported in this table are defined as the glucose concentration which decreases the initial BG activity without glucose by 50%. Only BGs with IC50 or K<sub>i</sub> values higher than 100 mM are reported in this table. A list of the studied glucose-inhibited BGs is available in the review of Teugjas 2013 (Teugjas & Väljamäe 2013b).

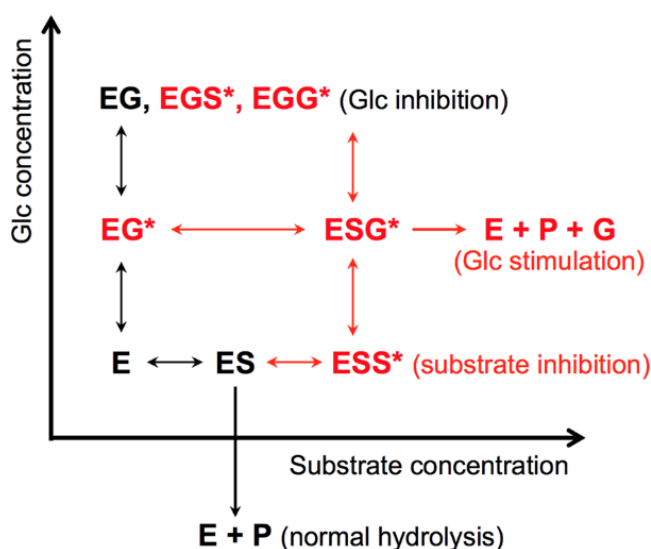
other parameters such as uncommon pH and temperature optima, excellent affinity for cellobiose ( $K_m = 0.77$  mM), ethanol activation (15 %v/v) /resistance (up to 40 % v/v) (Table 4), and finally it is not inhibited by cellobiose (at least up to 10 mM).

Finally, we tested the effect of BglC on cellulose degradation by commercialized enzyme mixtures, therefore under conditions more representatives of industrial processes. The first results obtained have shown the great potential of BglC as a candidate for lignocellulosic biomass hydrolysis under these conditions. Indeed, it allows to produce twice as much glucose when added to the commercialized DELTAGAS® AT-150 enzyme mixture during the cellulose hydrolysis process.

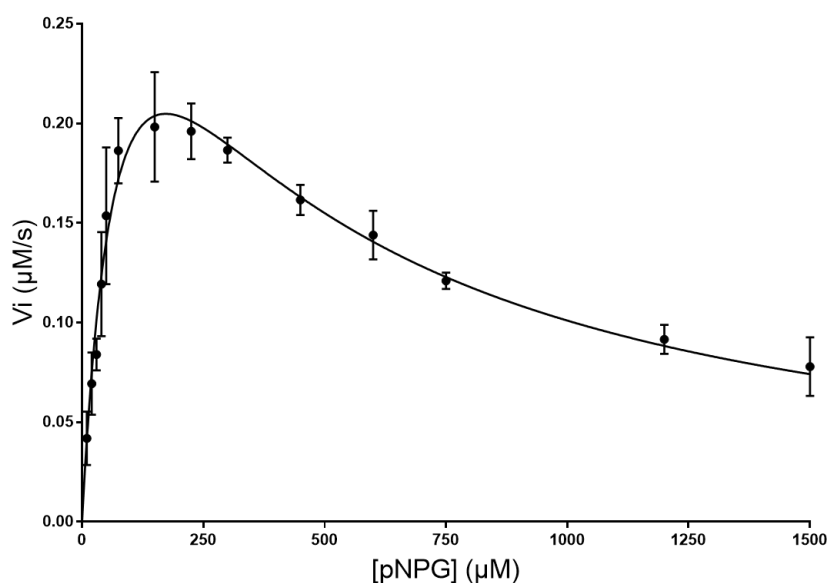
In conclusion, although some characteristics of BglC such as pH and temperature optima, kinetics parameters and high tolerance/stimulation toward/by inhibitors (monosaccharides, cellobiose, ethanol) can be separately found in other BGs, note all these characteristics in BglC makes it a unique BG selectable in some defined processes with specific set-up. Indeed, to the best of our knowledge, BglC of *S. scabies* is the first tolerant BG to high sugars and ethanol concentrations working at neutral pH and mesophilic temperatures. Moreover, we brought the evidence that this enzyme is able to enhance the glucose production yield when added to a commercialized enzyme mixture. Therefore, BglC can advantageously be used for highly efficient hydrolysis of lignocellulosic substrates into glucose that can be further or simultaneously fermented in ethanol or transformed in other high added-value molecules. Moreover, since BglC exhibits an activity toward aryl-beta-glucoside (such as *p*-NPβG) it could also be used in the field of aroma improvement of plant-derived products, where biocatalysts must function in e.g. fruit juices or wine containing high glucose and/or ethanol concentrations.



**Figure 83: Lateral view of the catalytic interface of HiBG.**  
The catalytic binding site (CBS) is located at the -1 subsite where glycerol (GOL) is bound while the non-catalytic binding site (NCBS) is located between the +1 and +2 subsite where glucose (GLC) is trapped by hydrophobic residues (W168, L173 and F348) (de Giuseppe et al. 2014)



**Figure 84: Schematic representation of BG reactions that could occur at different glucose and substrate concentrations.**  
E, enzyme; S, substrate; G, glucose. The reactions showed in red occur only in BG having a NCBS. Asterisks indicate the molecule which is bound to the NCBS (Guo et al. 2016).



**Figure 85: Curve of the initial velocity of BglC ( $V_i$ ) at different  $p$ -NP $\beta$ G concentrations**  
Rates of  $p$ -NP $\beta$ G degradation were obtained by measuring  $p$ -NP $\beta$  released at the beginning of the hydrolysis reaction performed in 50 mM HEPES buffer pH 7.5 at 26°C. Data were fitted to substrate inhibition equation (see point 8.4.3.4) using the GraphPad Prism 7 software.

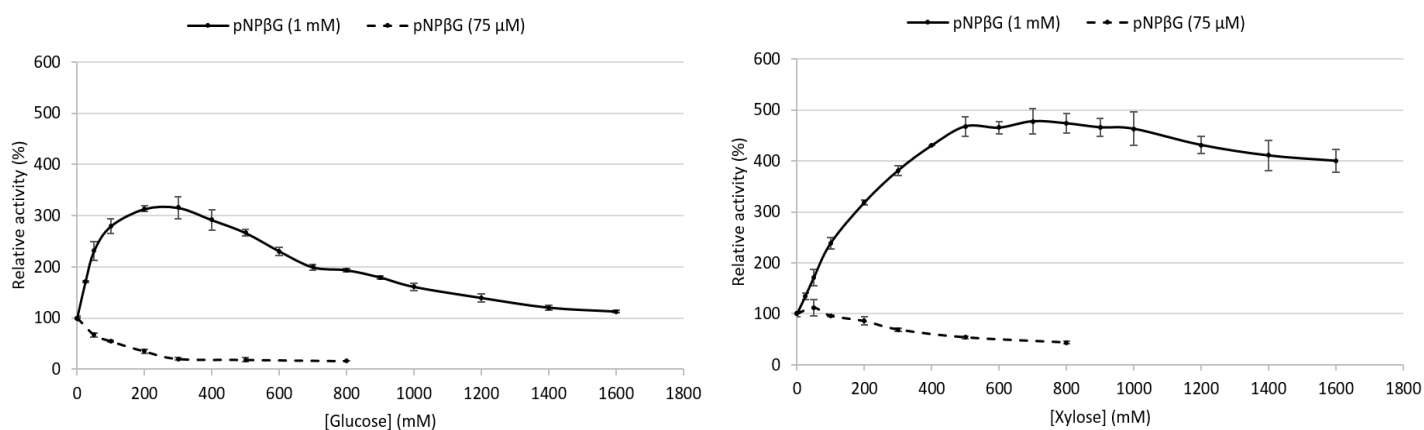


#### 5.2.4 Determination of the glucose effect on BGs activity using *p*-NPβG as substrate; most-likely a wrong procedure.

Recent studies investigated the molecular basis of glucose inhibition/tolerance/stimulation in BGs (de Giuseppe et al. 2014; Y. Yang et al. 2015; Guo et al. 2016; Matsuzawa et al. 2016; Jeng et al. 2011; Lee et al. 2012). Overall, the glucose inhibition of BG is due to competition between glucose and the substrate for the catalytic binding site (CBS). According to Giuseppe et al., glucose tolerance of some BGs would come from the depth and narrowness of the entrance channel which would prevent glucose to reach the CBS hence preventing the competitive inhibition (de Giuseppe et al. 2014). Additionally, glucose tolerance and stimulation of BG would be associated with a second non-catalytic binding site (NCBS) - located at the entrance channel (Figure 83) - which could be bound by both the substrate(s) of the BG or the product, glucose (de Giuseppe et al. 2014; Lee et al. 2012; Guo et al. 2016; Y. Yang et al. 2015). As shown on Figure 84, when the substrate binds both the CBS and the NCBS, it could lead to a substrate inhibition phenomenon. The glucose stimulation effect would result from displacement of the substrate from the NCBS which would enhance the BG activity i) by preventing the *substrate inhibition* phenomenon and/or ii) by favoring *transglycosylation* events, or iii) through a still unknown allosteric mechanism (Y. Yang et al. 2015; de Giuseppe et al. 2014; Guo et al. 2016). Finally, if glucose binds both the CBS and the NCBS it causes competitive inhibition with the substrate of the BG.

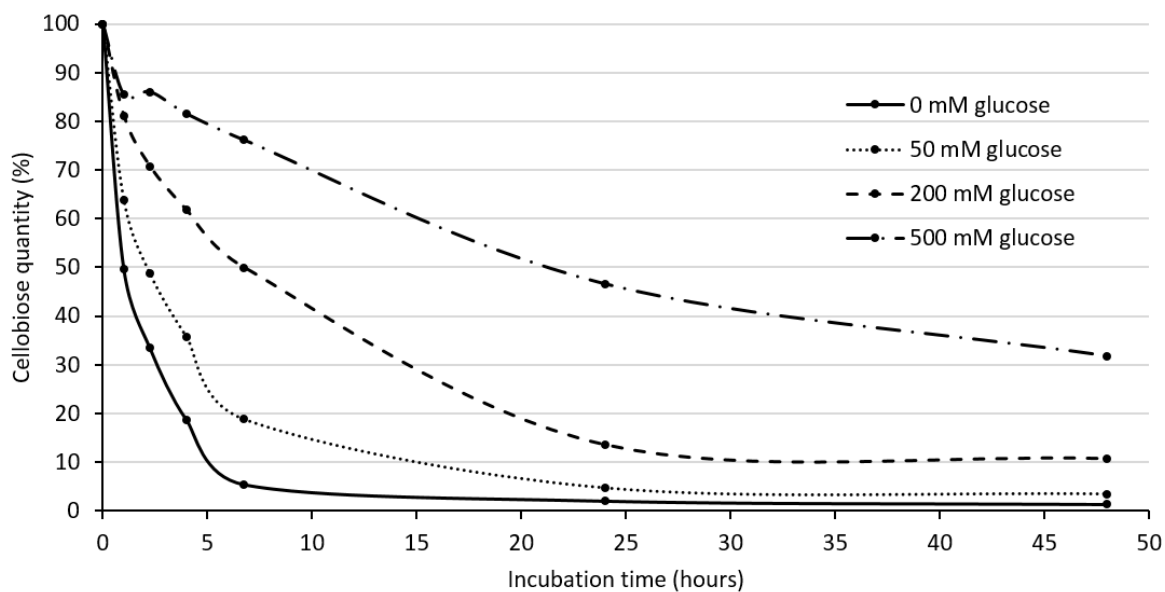
#### Glucose prevents the substrate inhibition of the BglC activity induced by *p*-NPβG

The recent suggestion by Guo et al that glucose stimulation of BG could be due to the prevention of the substrate inhibition phenomenon (Guo et al. 2016) prompted us to investigate if the observed glucose stimulatory effect of the activity of our BG (BglC) was due to this mechanism. Initial velocity experiments performed with *p*-NPβG as substrate showed that BglC is actually inhibited by low *p*-NPβG concentrations ( $K_i$  around 300  $\mu$ M) (Figure 85). These results mean that the *p*-NPβG concentration used in our glucose or xylose effect experiments (1 mM) (see point 5.2.3.2) strongly inhibited the BglC activity. We thus performed again these experiments with a *p*-NPβG concentration which does not inhibit the activity of BglC (75  $\mu$ M). In contrast to our previous assays, increasing the glucose or xylose concentration instead inhibited the relative activity of BglC when 75  $\mu$ M *p*-NPβG were used as substrate (Figure 86). These results suggest that the glucose stimulation previously observed with 1 mM *p*-NPβG was due to the prevention of a substrate inhibition effect. However, this glucose 'stimulatory' mechanism is likely not relevant when cellobiose – the natural substrate of BglC – is used as substrate since the BglC activity does not seem to be inhibited at high cellobiose concentrations (at least up to 10 mM Figure 68, see also box 2). As glucose inhibits BglC activity when *p*-NPβG is used at a non inhibitory concentration, it suggests that this enzyme would be more likely inhibited instead of



**Figure 86: *p*-NPβG concentration modifies the effect of D-glucose and D-xylose on BglC activity.**

Relative activity of the purified BglC on hydrolysis of *p*-NPβG supplied at inhibitory (1 mM) and non inhibitory (75 μM) concentrations and in presence of various concentrations of D-glucose (left) and D-xylose (right). The activity measured without any additive was fixed to 100 % (Control).



**Figure 87: Time course of cellobiose hydrolysis by BglC.**

50 mM cellobiose were incubated with purified BglC (0.5 μM) 48h at 30°C in 50 mM HEPES with or without addition of glucose. Samples were collected at several intervals and analyzed by HPLC.

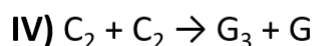
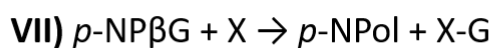
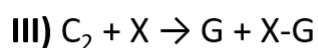
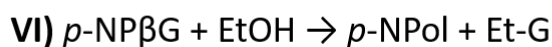
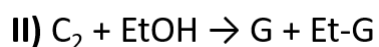
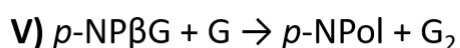
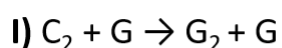
being stimulated by glucose when cellobiose is used as substrate. Therefore, the tolerance of BglC to the glucose generated during the hydrolysis of 50 mM cellobiose was further investigated during prolonged reaction time (48 hours). Cellobiose quantification was performed by HPLC and reported on graph presented in Figure 87. We observed that 95 % of the cellobiose was hydrolyzed after 7 h of incubation (Figure 87) which suggests a tolerance of BglC to the glucose concentrations generated during the process. However, the addition of exogenous glucose at higher concentrations in the reaction mixture tends to inhibit the BG activity of BglC. Indeed, only 81 %, 50 % and 24 % of cellobiose were hydrolysed after 7 h of incubation with 50 mM, 200 mM and 500 mM of glucose, respectively. However, since these glucose concentrations did not entirely inhibit the activity of BglC, this enzyme can be considered as a glucose tolerant BG. Further work will be required to determine the glucose inhibition parameters using cellobiose as substrate, nonetheless it will be difficult to compare the glucose tolerance of BglC to other BGs reported in literature since most studies determined these parameters with *p*-NPβG as substrate instead of cellobiose.

#### **Glucose-induced transglycosylation events stimulate the BG activity with *p*-NPβG as substrate**

Transglycosylation involving one substrate molecule and another hydroxyl-donor molecule can lead to BG stimulation when *p*-NPβG is used as substrate but leads to BGs inhibition with cellobiose as substrate (Figure 88). This stimulation induced by the transglycosylation event occurs when the covalent glucosyl-enzyme intermediate (E-G<sub>1</sub>) reacts preferentially with glucose (or another molecule than the substrate) rather than with a water molecule which leads to an increased turnover of the BG (Uchima et al. 2011; Uchiyama et al. 2013; de Giuseppe et al. 2014; Zanoelo et al. 2004; Teugjas & Väljamäe 2013b). However, the transglycosylation event occurring with *p*-NPβG and glucose leads to the release of *p*-NPoI and (glucose)<sub>2</sub> whereas when this reaction occurs in the presence of cellobiose and glucose it releases a dimer of glucose (not necessarily cellobiose) and glucose (Figure 88 I and V). Since the BG activity is determined from *p*-NPoI measurement when *p*-NPβG is used as substrate, a glucose stimulation of BG is observed. Contrariwise, when the BG activity is determined with cellobiose as substrate it is usually based on the quantification of the glucose released. However, no variation of the amount of glucose is observed<sup>15</sup> when transglycosylation events occur between glucose and cellobiose (Figure 88 I). Taken together, these considerations indicate that glucose stimulation of BGs obtained with *p*-NPβG as substrate will not be observed when the natural substrate will be used. This conclusion is also applicable when other monosaccharides or ethanol (which, as glucose, stimulate the BG activity with *p*-NPβG as substrate Table 3) are present although in these cases the amounts of glucose generated from cellobiose hydrolysis will increase in any case (Figure 88 II and III).

---

<sup>15</sup> Low glucose variations can occur depending of the equilibrium between hydrolysis and transglycosylation which will depend of glucose concentration



**Figure 88 : Transglycosylation reactions that could occur with *p*-NPβG or cellobiose as substrate**

$C_2$ : cellobiose, G: glucose,  $G_2$  glucose dimer,  $G_3$  glucose trimer, EtOH: ethanol, X: xylose. When velocity of these transglycosylation reactions are higher than hydrolysis reactions it will increase product formation and reactif disappearance rate compared to hydrolysis. When *p*-NPβG is used as substrate (from V to VIII), BG activity is stimulated by transglycosylation. Indeed, *p*-NPol (which is measured to determine BG activity) is always released. Contrariwise, when cellobiose is used as substrate (from I to IV), transglycosylation release only one glucose molecule instead of two as observed for hydrolysis. However, when transglycosylation occurs between glucose and cellobiose (I), it leads to formation of a glucose dimer (which can be cellobiose) and glucose concentration did not change. Finally, when transglycosylation occurs between two cellobiose molecules it leads to substrat inhibition. Even if these transglycosylation reactions prevent CBH inhibitions by decreasing cellobiose concentration, they are not desirable in lignocellulosic saccharification in which glucose is the wanted product. Note that these transglycosylation reactions can be reversible for some BGs.

**Box 2: High cellobiose concentrations could lead to substrate inhibition of BglC**

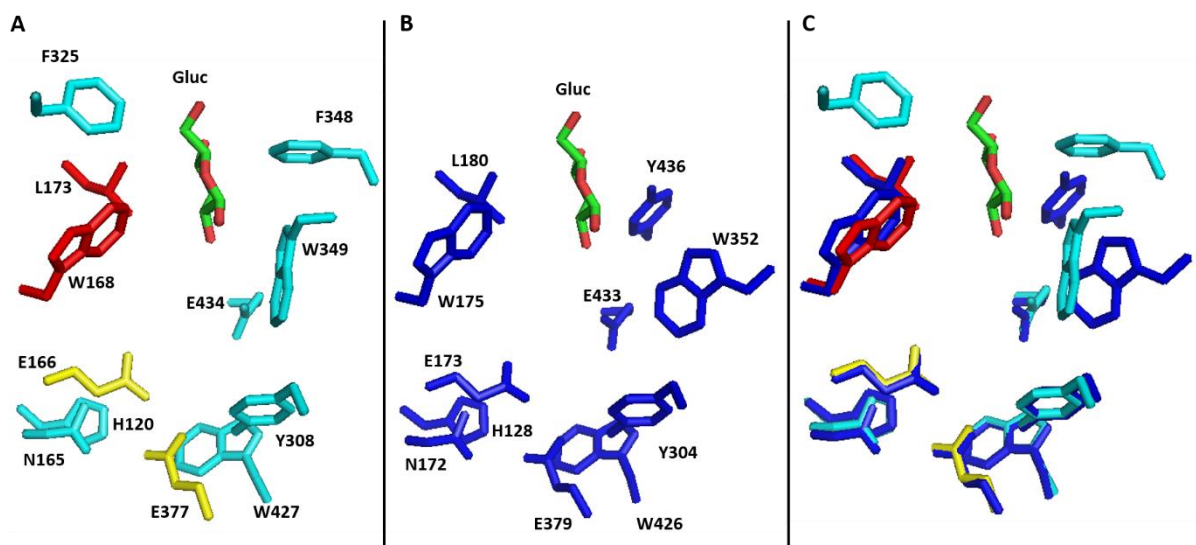
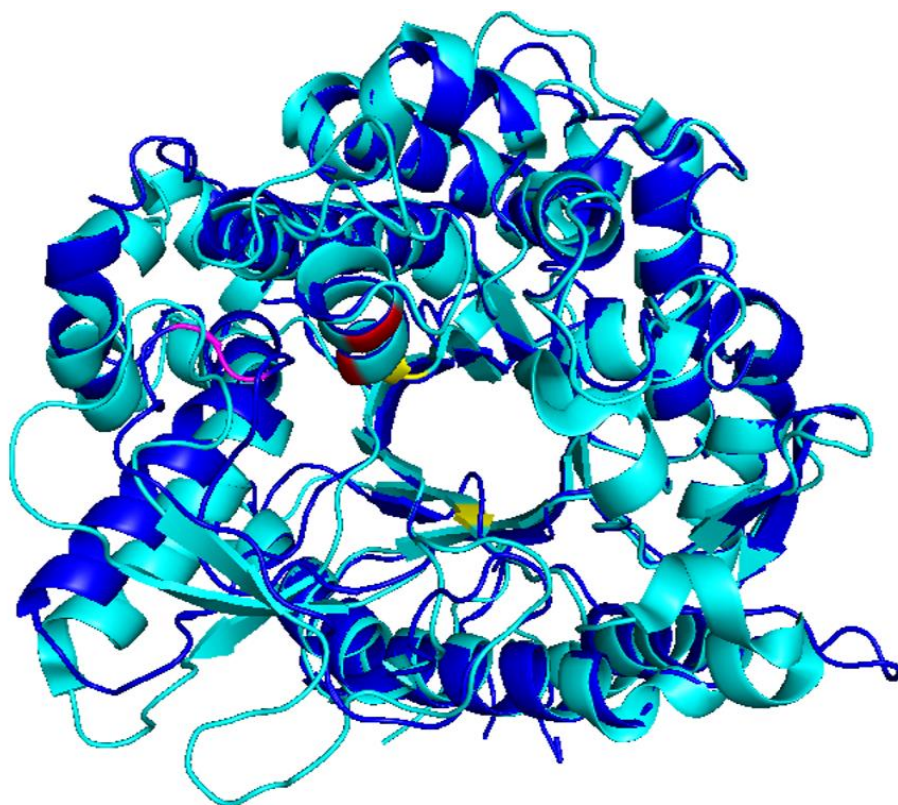
HPLC analyses detected glucose as the main product generated in the course of cellobiose (50 mM) hydrolysis by BglC. Nevertheless an unidentified trisaccharide was detected at the first time points but was finally hydrolysed into glucose when cellobiose reached lower concentrations (data not shown). Indeed, the transglycosylation activity of BglC leading to trisaccharide formation seems to be enhanced by increasing concentrations of cellobiose but would be independent of the glucose concentration. Since this transglycosylation activity is only observed at high cellobiose concentrations (detected at 50 mM), it would be interesting to know which cellobiose concentrations are reached in lignocellulose hydrolysis industrial processes in which BGs are expected to be used. However, since cellobiohydrolases (CBH) are inhibited at ranges of few millimolar of cellobiose (Grano et al. 2004; Murphy et al. 2013; Park et al. 2012; Jalak et al. 2012), it is unlikely that cellobiose concentrations encountered in saccharification processes could reach the concentration ranges that trigger the transglycosylation activity of BglC. This transglycosylation activity induced by cellobiose suggests that this substrate could inhibit the BG activity of BglC at concentrations higher than 10 mM.

In conclusion, further investigations will be required to verify if the glucose inhibitory effect on BglC when cellobiose is used as substrate (Figure 87) is due to transglycosylation activity instead of a classical competitive inhibition. Indeed, since our HPLC analysis methods could not allow to distinguish glucose dimers we can not exclude that another glucose dimer possess a nearly identical retention time than cellobiose.

## Conclusion

The chromogenic substrate *p*-NPβG is almost always used to determine the glucose tolerance/stimulation parameters of BGs and are ultimately used for 'ranking' the enzymes according to their potential as good candidate in lignocellulose saccharification processes (see references in Table 4). *p*-NPβG utilization allows to quickly and easily collect data whereas cellobiose and glucose measurements are more time consuming. However, our investigations suggest that glucose tolerance properties determined with *p*NPβG as substrate can be misinterpreted. Consequently, the classification of glucose resistant BGs based on kinetic parameters determined with *p*NPβG is most likely erratic. Indeed, since authors did not verify or mention if their BG exhibited a transglycosylation activity and/or substrate inhibition phenomenon, we anticipated that many of the BGs reported as being stimulated by glucose using *p*-NPβG would not be stimulated when cellobiose is used as substrate. However, this wrong 'interpretation' of a glucose-stimulated effect does not necessarily mean that these BGs do not display a certain tolerance to glucose when cellobiose is used as substrate (as shown for BglC of *S. scabies*) and therefore could indeed be of interest in industrial processes

Therefore, we propose that the classification of BGs according to their tolerance to glucose should be based on kinetic parameters ( $K_i$ ) determined using cellobiose as substrate rather than *p*-NPβG. We could also add that glucose effect experiments on BGs should be performed at glucose and cellobiose concentrations encountered in the industrial processes in which these BGs are expected to be used.



**Figure 89: Surimposition of the HiBG structure and the model of BglC.**

Top: Surimposition of cartoon representations of the structure of HiBG (light bleu) and the 3D model of BglC (dark blue). The catalytic residues Glu 166 and Glu 377 are shown in yellow. Trp 168 and Leu 173 (in the NCBS) which are involved in glucose tolerance/stimulation are shown in red. G315 and P333 between which 17 amino acids are missing in the BglC model are shown in pink. Bottom: Surimposition of catalytic interfaces of HiBG and BglC. A. Amino acids forming the catalytic interface of HiBG. The Glucose (Gluc) trapped at NCBS is shown in green and red. B. Corresponding amino acids of the catalytic interface of modeled BglC. Interestingly, the surimposition of our model with the HiBG structure (C) shows that the position of most of the amino acids from -1 and +1 subsites are well conserved between the two proteins.

### 5.2.5 Perspectives

Structure comparison as well as biochemical characteristics of glucose tolerant and glucose inhibited BGs led to the identification of amino acids potentially involved in glucose tolerance, catalytic efficiency or in thermal and pH tolerance/stability of BGs (de Giuseppe et al. 2014; Y. Yang et al. 2015; Guo et al. 2016; Matsuzawa et al. 2016; Jeng et al. 2011; Lee et al. 2012). Amino acids involved in glucose tolerance of BGs were identified from structural and biochemical analyses of crystallized BGs. The first crystallographic structure of a highly glucose tolerant BG was obtained from HiBG (PDB: 4MDP), a BG isolated from the fungi *Humicola insolens* (Souza et al. 2010; de Giuseppe et al. 2014). The catalytic residues Glu 166 and Glu 377 are located at the subsite -1 (Figure 83). Trp 168, and Leu 173 are located at the NCBS (subsite +1 and +2) (de Giuseppe et al. 2014) and have been proved to be involved in glucose tolerance and stimulation of CelA1 (PDB: 3AHY) (F. Yang et al. 2015; Lee et al. 2012; Guo et al. 2016). Otherwise, Cao et al. obtained a thermostable mutant M3 following random substitution of three amino acids (W174C, A404V and L441F) from its thermosensible Bgl6 wild-type form (Cao et al. 2015). Also, Yang et al. observed that in addition to some specific important amino acids, the overall BG structure influences interactions between the BG and its ligands (Y. Yang et al. 2015). Finally the Asn 223 located between the subsite +1 and +2 of Td2F2 (PDB: 3WH6) has been recently identified to be involved in transglycosylation and therefore in glucose stimulation of this BG (Matsuzawa et al. 2016).

Since BglC from *S. scabies* is a potentially new glucose tolerant BG we built its 3D model using Phyre2 web portal (Kelley et al. 2015) to compare it with structures of characterized glucose tolerant/stimulated BGs previously discussed in order to identify amino acids involved in BG-ligand interactions. Interestingly, surimposition of our model with the HiBG structure shows that positions of most amino acids from -1 and +1 subsites are conserved, including the two catalytic residues of CBS, as well as the Trp and Leu from NCBS (Figure 89). However, since our model does not fit perfectly with the HiBG structure, it is earlier to draw conclusions about the role of certain amino acids in glucose tolerance of BglC. For example, 17 amino acids between G315 and P333 were not taken into account for the modelling of BglC. Based on the predicted model, these missing amino acids could be close from the entrance channel and the NCBS and thus could participate in glucose tolerance of BglC (Figure 89). Sequences alignment of BglC orthologues showed that all residues thought to be in the catalytic interface are conserved among *Streptomyces*, but interestingly two short regions (from 294 to 297 and from 318 to 322) exhibit an important sequence dissimilarity. Therefore, it could be interesting to produce and purify these orthologues and evaluate their tolerance to glucose in order to know whether these features are common among *Streptomyces* or specifically involved in the glucose tolerance property. Since saccharification in acidic conditions are more widely used processes, it could be interesting to broaden



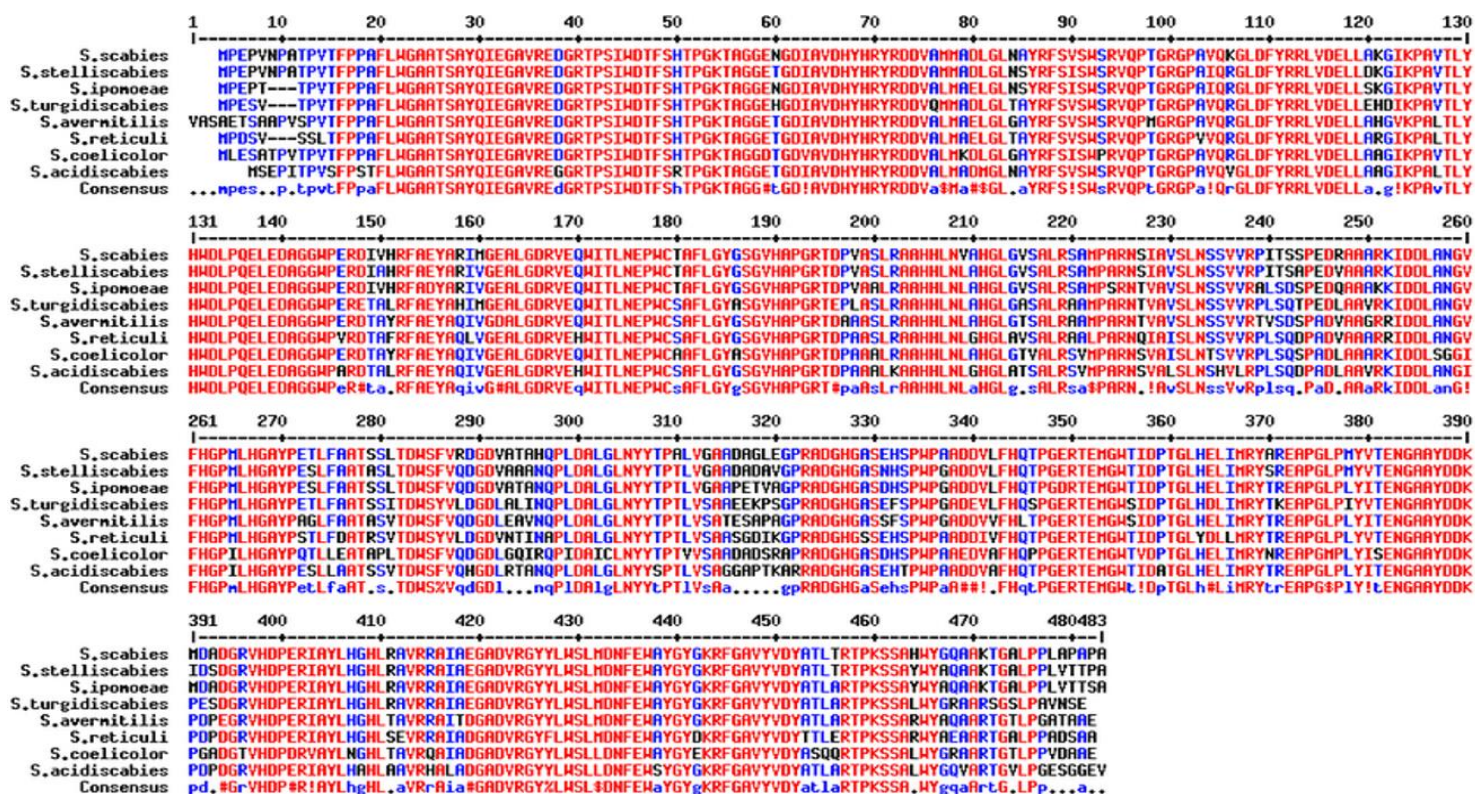


Figure 90 : Multiple alignments of amino acid sequences of BglC orthologues from *Streptomyces* species

Red: Identical positions. Blue: highly conserved positions. Black: poorly conserved positions.

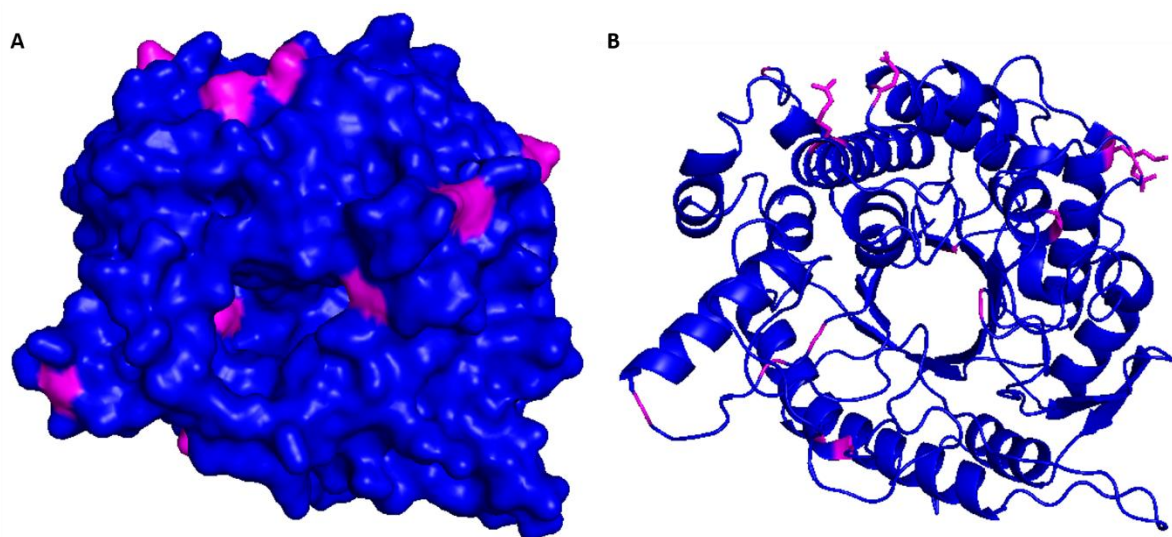


Figure 91 : Modeled BglC from *S. acidiscabies*

A. Surface and B. cartoon representation of modeled BglC from *S. acidiscabies*. Amino acids identified as being specific to BglC from *S. acidiscabies* are shown in pink.



the range of pH at which BglC from *S. scabies* is active. Identification of amino acids involved in pH stability of BglC could be provided by the analysis of the BglC orthologue from *S. acidiscabies* which grows under acidic conditions. Interestingly, we noted that BglC from *S. acidiscabies* exhibits mutations that are unique among all other BglC orthologues from the *Streptomyces* species investigated (Figure 90). For instance, D35 and K103 (charged amino acids) of BglC from *S. scabies* are replaced by G and V (non charged amino acids) in the sequence of BglC of *S. acidiscabies*. In addition, E143 and R199 are changed into A and K, respectively. Interestingly, based on our structural model, these paired amino acids are predicted to be located on the surface of the enzyme and could thus participate in pH stability of the enzyme (Figure 91). Based on these informations, it is possible to engineer known BGs in order to improve some of their characteristics and adapt them to specific processes. However, some parameters will probably be difficult to improve without affecting other properties of these enzymes. For instance, from the data available, it seems that glucose tolerant BGs cannot exhibit a high catalytic efficiency (Teugjas & Väljamäe 2013b). Compromises have to be reached between catalytic efficiency and tolerance to the generated product.



## 6 Discussion générale

Les connaissances acquises suite aux travaux antérieurs réalisés par les membres du groupe de Rosemary Loria combinées aux résultats obtenus durant cette thèse nous permettent de proposer différents modèles suggérant les circonstances lors desquelles *S. scabies* pourrait déclencher sa pathogénicité dans son environnement naturel. Comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises, le caractère phytopathogène de *S. scabies* est directement lié à sa capacité à produire la thaxtomine. L'expression des gènes de biosynthèse de cette phytotoxine est soumise à deux niveaux de contrôle. D'une part, un niveau de contrôle transcriptionnel *via* le répresseur CebR (voir résultats point 4.1) et l'activateur TxtR (M. V. Joshi et al. 2007) (voir introduction point 2.6.1.2) et, d'autre part, un niveau de contrôle post-transcriptionnel *via* *bldA* codant pour l'ARN de transfert tRNA-Leu<sup>TTA</sup> (Dawn R D Bignell et al. 2014). Les deux conditions nécessaires au déclenchement de la pathogénicité de *S. scabies* sont donc d'une part, la levée de la répression par CebR de l'expression de *txtR* et, d'autre part, l'expression de *bldA* permettant la traduction de l'ARNm de TxtR et donc l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtomine. Nous présenterons dans cette discussion les différentes circonstances environnementales qui, selon nous, permettraient que ces deux conditions soient réunies. Nous discuterons également des hypothèses permettant d'expliquer comment *S. scabies* différencierait les tissus végétaux vivants des tissus végétaux en décomposition.

### 6.1 La levée de la répression par CebR

Durant cette thèse nous avons identifié le cellobiose ((Glc)<sub>2</sub>) et, dans une moindre mesure, le cellotriose ((Glc)<sub>3</sub>) comme étant les effecteurs allostériques de CebR. En d'autres termes, l'accumulation de ces cellooligosaccharides dans le cytoplasme de la bactérie inhibe la capacité de CebR à lier l'ADN et donc permet l'expression des gènes nécessaires à la biosynthèse de thaxtomine. Notons que nos résultats démontrent également que l'effet de ces sucres sur la production de thaxtomine est principalement dû à la levée de répression exercée par CebR plutôt qu'à l'activation de TxtR complexé au cellobiose comme cela avait été postulé précédemment (M. V. Joshi et al. 2007). En effet, l'inactivation de *cebR* conduit à la production de thaxtomine indépendamment de la présence de (Glc)<sub>2</sub> ou (Glc)<sub>3</sub> dans le milieu de culture, suggérant que TxtR peut jouer son rôle d'activateur transcriptionnel sans être complexé au (Glc)<sub>2</sub>. Nous avons ensuite démontré l'implication de l'ABC transporteur CebEFG-MsiK (également contrôlé par CebR) dans le transport de (Glc)<sub>2</sub> et de (Glc)<sub>3</sub> chez *S. scabies*. La présence de (Glc)<sub>2</sub> et de (Glc)<sub>3</sub> dans l'environnement de *S. scabies* est donc requise pour remplir la première condition permettant à la bactérie de déclencher sa pathogénicité.

Cependant, la sélection par *S. scabies* de produits de dégradation de la source de carbone la plus abondante sur terre – la cellulose – comme signal inducteur de sa pathogénicité est surprenante.

En effet, bien qu'il n'y ait pas de données dans la littérature sur la quantification des différents celooligosaccharides dans l'environnement, il est probable que ceux-ci soient relativement abondants en fonction des types de sols envisagés et de la végétation qui y est associée. La connaissance de l'origine du signal éliciteur – tissus végétaux vivants ou morts – nous semble être une composante essentielle associée au mode de vie pathogène de *S. scabies*. En effet, il serait énergétiquement défavorable – et constituerait aussi un 'non-sens' biologique – que *S. scabies* doive systématiquement coordonner la production de phytotoxine au transport de celooligosaccharides si ces derniers proviennent de végétaux déjà morts. *S. scabies* devrait donc être capable de pouvoir discerner ces deux situations ou, indirectement, ces situations différentes génèreraient des conditions propices ou non à l'induction du comportement phytopathogène de *S. scabies*.

Nous décrirons dans les deux points suivants l'origine possible (tissus vivants ou morts) des celooligosaccharides qui permettront la levée de la répression du régulateur CebR sur les gènes nécessaires à la biosynthèse de thaxtomine.

#### **6.1.1 Celooligosaccharides provenant d'un tissu végétal vivant**

De manière très intéressante, Johnson *et al* ont montré que du cellotriose (mais jamais de cellobiose) était présent dans les exsudats de plantules de radis en croissance ainsi que dans des suspensions de cellules de tabac (Johnson et al. 2007). D'autre part, bien que le cellobiose soit toujours utilisé comme inducteur de la production de thaxtomine en condition de laboratoire, le cellotriose s'avère être un meilleur inducteur que le disaccharide (Johnson et al. 2007). Il n'est cependant que rarement utilisé dans les milieux de culture car beaucoup plus onéreux. Ces observations suggèrent que le cellotriose pourrait être LA molécule 'signal' indiquant à *S. scabies* la présence d'un réseau racinaire en croissance dans son environnement proche. En effet, la perception du cellotriose par *S. scabies* pourrait signaler la présence d'un tissu végétal en expansion qui constitue non seulement le site d'invasion du pathogène mais aussi le site d'action de la thaxtomine. De plus, Johnson *et al* ont également montré que l'ajout de thaxtomine entraînait une augmentation de la quantité de cellotriose relargué par les tissus en croissance. Ainsi, une faible quantité de cellotriose dans le sol pourrait être suffisante pour initier la production de thaxtomine qui à son tour entraînerait le relargage d'une plus grande quantité de cellotriose ce qui déclencherait la production massive de phytotoxine. La thaxtomine permettrait ainsi de générer son propre inducteur comme Johnson *et al* l'ont proposé précédemment.

Ces observations suggèrent que *S. scabies* aurait adapté sa physiologie afin de répondre à de faibles concentrations en cellotriose. Ces adaptations pourraient notamment résulter de mutations subtiles apparues au sein de sites de régulation ou au sein des gènes codant pour les différents acteurs impliqués dans le déclenchement de la synthèse de thaxtomine. De manière intéressante, nous avons

montré que la lipoprotéine CebE de *S. scabies* présente de fortes affinités pour le cellobiose et le cellotriose, lesquelles sont respectivement de 100 à 1000 fois plus élevées que celles mesurées pour l'orthologue de CebE de *S. reticuli* (Schlösser & Schrempf 1996). L'excellente affinité de CebE pour le cellotriose pourrait donc être le résultat d'une adaptation permettant à *S. scabies* de percevoir les très faibles quantités de cellotriose relargué par ses hôtes dans son environnement. Aussi, il est intéressant de noter que chez *S. scabies* les *cbs* identifiés en amont des gènes nécessaires à l'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses sont constitués du palindrome parfait TGGGAGCGCTCCCA pour lequel le répresseur CebR possède la plus grande affinité (Table 7). Au contraire, les séquences des *cbs* identifiées en amont de *txtR-txtA*, dans *txtB* et en amont de *bgIC* présentent des « erreurs » qui diminuent l'affinité de CebR pour ces *cbs*. L'accumulation de (Glc)<sub>3</sub> dans la cellule aurait pour effet de diminuer la proportion de CebR capable de lier ses éléments *cis*. Puisque ce régulateur présenterait moins d'affinités pour les *cbs* non palindromiques, la répression de l'expression des gènes *txtR-txtAB* et *bgIC* serait levée alors que celle exercée sur les gènes responsables de l'utilisation des polysaccharides d'origine végétale serait maintenue. Ainsi la perception des faibles concentrations en (Glc)<sub>3</sub> entrainerait parallèlement l'expression de *bgIC*, dont le produit commencerait à cliver le (Glc)<sub>3</sub> en (Glc)<sub>2</sub> (meilleur effecteur de CebR), et la dérégulation de l'expression des gènes *txtR-txtAB* permettant à la bactérie de produire de la thaxtamine (lorsque le tRNA-Leu<sup>TTA</sup> encodé par *bldA* est présent en suffisance pour permettre la traduction de TxtR). La faible quantité de phytotoxine produite perturberait localement la synthèse de cellulose des tissus racinaires et entrainerait donc une augmentation de la quantité de (Glc)<sub>3</sub> relargué ce qui activerait d'autant plus l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine et *in fine* l'expression des gènes responsables de l'utilisation des polysaccharides de la paroi végétale de l'hôte.

Confirmer la présence de cellotriose dans les exsudats des différents hôtes de *S. scabies* permettrait de renforcer l'hypothèse présentée ci-avant. Aussi, des analyses structurales comparatives sont nécessaires pour comprendre pourquoi la lipoprotéine CebE de *S. scabies* présente une telle affinité pour le cellotriose, mais également si ces caractéristiques sont uniquement présentes chez les autres phytopathogènes tels que *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*. Si seules les protéines CebE des streptomycètes phytopathogènes présentent une meilleure affinité pour le cellotriose que pour le cellobiose, cette caractéristique pourrait être une condition nécessaire au comportement pathogène du microorganisme. Toutefois, à ce stade, nous ne pouvons pas définitivement exclure que d'autres protéines puissent également participer à la perception, au transport et à la dégradation des cellooligosaccharides. En effet, il serait intéressant de connaître l'implication des deux opérons paralogues à *cebR-cebEFG* (*SCAB2431-SCAB2421*, *2411*, *2401* et *SCAB77281-SCAB77271*, *77261*, *77251*) dans la perception et/ou le transport des cellooligosaccharides et donc dans l'induction de la pathogénicité de *S. scabies*.

### 6.1.2 Cellooligosaccharides provenant d'un tissu végétal mort

La présence de cellooligosaccharides dans un environnement dépourvu d'hôtes potentiels pourrait provenir de la dégradation de la cellulose issue de tissus végétaux morts soit par l'action de microorganismes cellulolytiques du sol ou soit par *S. scabies* lui-même. Cette dernière option semble néanmoins peu probable. En effet, bien que l'on retrouve l'ensemble des gènes nécessaires à l'utilisation de la cellulose dans le génome de *S. scabies*, il a été rapporté que cette espèce semble incapable d'utiliser ce polysaccharide lorsque celui-ci est proposé comme seule source de carbone disponible (Johnson et al. 2007). Ainsi, lorsque *S. scabies* se trouve dans un environnement riche en matière organique végétale morte (donc riche en cellulose) et en absence d'un tissu en croissance, il est peu probable que celui-ci puisse générer ses propres inducteurs de pathogénicité (voir perspective point 7.1.1).

En revanche, de nombreux microorganismes cellulolytiques du sol sécrètent des cellulases extracellulaires qui sont susceptibles de générer des cellooligosaccharides (dont potentiellement du  $(\text{Glc})_2$  et du  $(\text{Glc})_3$ ) à partir de la cellulose issue de la biomasse végétale résiduaire. Cependant, à notre connaissance, aucune donnée qualitative ou quantitative relative à la présence de cellooligosaccharides dans différents types de sols n'est disponible dans la littérature. Dès lors, il est difficile de spéculer si *S. scabies* serait ou non en mesure de déclencher la production de thaxtomine en présence de matière végétale morte. En effet, soit on postule que les quantités en  $(\text{Glc})_2$  et  $(\text{Glc})_3$  présentes dans les sols en décomposition sont négligeables car directement assimilées par les saprophytes et dans ce cas elles ne permettraient donc pas d'induire la production massive de thaxtomine par *S. scabies*. Soit, au contraire on considère que les microorganismes cellulolytiques du sol génèrent de grandes quantités de cellobiose et/ou de cellotriose dont une partie serait accessible aux microorganismes commensaux tels que *S. scabies* grâce à la forte affinité de CebE pour le  $(\text{Glc})_2$  et le  $(\text{Glc})_3$ . Dans ces conditions, comment *S. scabies* différencierait-il l'origine de ces sucres inducteurs afin d'empêcher le déclenchement de la production de thaxtomine et donc son caractère phytopathogène? Il serait effectivement déraisonnable que *S. scabies*, dans un environnement dépourvu d'hôtes vivants, déclenche ce processus coûteux en énergie et opère le changement de mode de vie de saprophyte à pathogène alors que le contexte nutritionnel est inapproprié. L'hypothèse la plus convaincante que nous pouvons proposer à ce stade de nos connaissances fait intervenir le second niveau de contrôle impliquant le gène *bldA* codant pour le tRNA-Leu<sup>TTA</sup>.

## 6.2 L'expression de *bldA*

Bien que la présence de  $(\text{Glc})_2$  et/ou  $(\text{Glc})_3$  soit une condition indispensable pour permettre la transcription des gènes de biosynthèse de thaxtomine, elle n'est cependant pas suffisante. En effet, la traduction de l'activateur transcriptionnel TxtR - sans lequel la transcription des gènes de biosynthèses

de thaxtamine ne peut avoir lieu - est dépendante de l'expression du gène *bldA* codant pour l'unique leucyl-ARNt capable de reconnaître le codon UUA des ARNm chez les *Streptomyces* (voir introduction point 1.2.1.1.1). La régulation post-transcriptionnelle par *bldA* est un processus commun à tous les *Streptomyces*. En effet, lorsqu'un membre de ce genre bactérien fait face à un stress (nutritionnel ou autre) l'empêchant de croître davantage, il induit la transcription de *bldA* afin de permettre la traduction d'ARNm codant pour des protéines lui permettant de s'adapter de manière transitoire en attendant que les conditions environnementales s'améliorent (Chater & Chandra 2008). Ces informations concordent avec le fait que *bldA* n'est exprimé qu'en fin de première phase exponentielle de croissance (Lawlor et al. 1987), c'est-à-dire juste avant la phase de transition au cours de laquelle la bactérie déclenche ses processus de différenciations physiologique et morphologique (voir introduction point 1.2). En d'autres termes, *bldA* serait un peu le régulateur de la 'dernière chance'. En effet, son expression permettrait à la bactérie de s'adapter par la production de métabolites spécialisés et/ou de se soustraire aux conditions adverses en déclenchant la différenciation du mycélium végétatif en hyphes aériens et en chaînes de spores afin de préserver l'espèce.

Dès lors, dans un environnement permettant sa croissance, *S. scabies* serait incapable de produire de la thaxtamine et cela même en présence de (Glc)<sub>2</sub> et/ou de (Glc)<sub>3</sub>. En effet, ce n'est que lorsque le stade développemental précédant la phase de transition serait atteint (c'est-à-dire lorsque la quantité de tRNA-Leu<sup>TTA</sup> serait suffisante) que la bactérie serait à même de synthétiser la phytotoxine.

### 6.3 Modèles proposés

L'ensemble des informations et postulats décrits précédemment nous permet de proposer un modèle permettant d'expliquer comment *S. scabies* produirait la thaxtamine dans les conditions appropriées (Figure 92). Deux cas de figure sont envisagés : i) soit *S. scabies* croît dans un environnement proche d'un hôte potentiel libérant du (Glc)<sub>3</sub> ou ii) soit la bactérie évolue dans un environnement dépourvu d'hôtes mais riche en (Glc)<sub>2</sub> et/ou (Glc)<sub>3</sub> issus de la décomposition de la matière végétale résiduaire. Dans les deux situations, la bactérie subira tôt ou tard un stress, nutritionnel ou autre, entraînant l'expression et l'accumulation de *bldA* dans ses cellules. Étant donné la présence possible de cellooligosaccharides dans les deux environnements, l'expression de *bldA* permettrait à la bactérie d'initier la production de thaxtamine. Cependant, dans le cas i) la phytotoxine aura pour effet d'entraîner un relargage plus important de (Glc)<sub>3</sub> mais également de rendre accessible à *S. scabies* d'autres sources nutritives dont notamment le polysaccharide de réserve des plantes que constitue l'amidon. Ce nouvel apport nutritif permettrait à *S. scabies* de continuer à croître de manière prospère et retarderait le déclenchement du processus de sporulation et donc la mise en dormance de l'organisme. Au contraire, dans le cas ii) la production de thaxtamine n'engendrerait l'apparition d'aucune nouvelle source nutritive. Dès lors, la bactérie poursuivrait son processus de différenciation morphologique conduisant à la formation de spores afin de préserver l'espèce. Cela signifie que dans les deux cas *S. scabies* commencera par se nourrir des cellooligosaccharides de son environnement, mais qu'une fois que l'expression de *bldA* aura débutée, seule la présence d'un hôte vivant sécrétant continuellement du (Glc)<sub>3</sub> permettra la production prolongée de thaxtamine.

Une autre hypothèse beaucoup plus simple serait d'envisager que *S. scabies* aurait évolué de manière à ne pas pouvoir initier le réveil métabolique de ses spores qu'en présence d'hôtes potentiels. En effet, il est possible que la germination des spores de *S. scabies* n'ait lieu qu'en présence de certains éléments présents dans la rhizosphère de ses hôtes. Dès lors, la perception des cellooligosaccharides de son environnement signifierait automatiquement la présence d'un tissu végétal vivant. À ce jour, aucune étude n'a été menée afin de connaître les conditions favorisant la germination des spores de *S. scabies*.







## 7 Perspectives

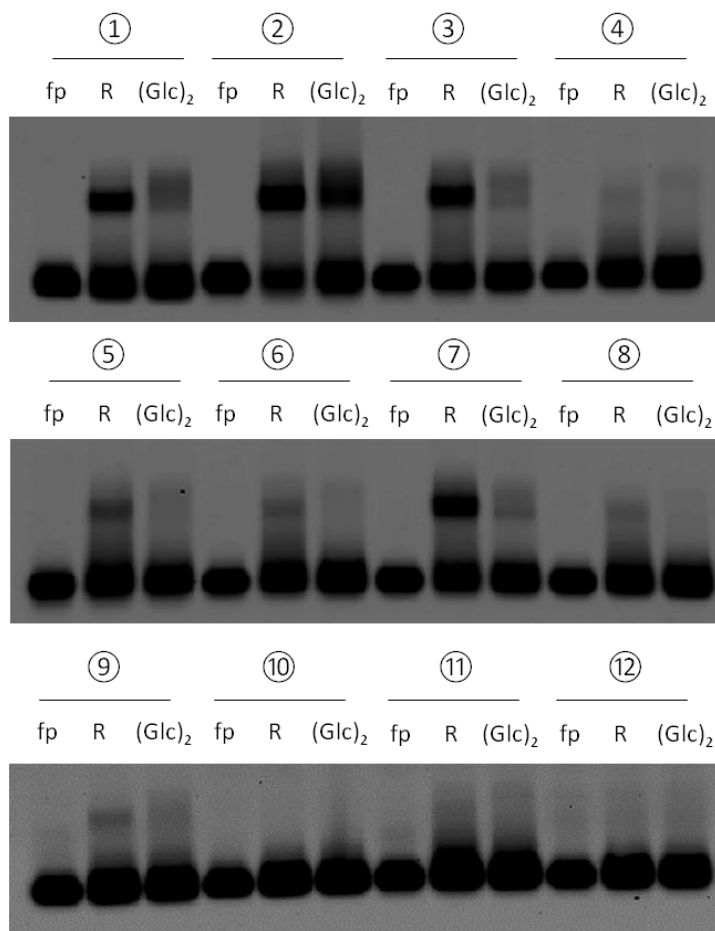
### 7.1 Analyse du régulon CebR chez *S. scabies*

En dehors des gènes dont nous avons discuté préalablement et qui ont fait l'objet des résultats majeurs de cette thèse, la prédiction du régulon CebR chez *Streptomyces scabies* a permis d'identifier d'autres gènes potentiellement contrôlés par ce régulateur. En effet, de nombreuses séquences *cis* similaires au *cbs* (consensus TGGGAGCGCTCCCA) ont été identifiées en amont de gènes codant majoritairement pour des protéines intervenant dans la dégradation des polysaccharides, mais également associées à d'autres régulateurs transcriptionnels (Table 7). Afin de valider expérimentalement les résultats de la prédiction, nous avons réalisé de nouvelles expériences de retard de migration électrophorétique (EMSA) entre le régulateur CebR et les séquences identifiées possédant un score supérieur à 9,99 (Rigali et al. 2015) (Figure 93). Après analyse, seules les séquences dont le score est supérieur ou égal à 12,37 (numéros 1 à 9 sur la Figure 93) semblent reconnues et liées spécifiquement par CebR. Les *cbs* (CebR binding site) identifiés par le programme PREDetector chez *S. scabies* puis validés par EMSA consistent en des séquences palindromiques proches du consensus TGGGAGCGCTCCCA où sont tolérées une ou deux mutations maximum (Figure 94). Ces validations *in vitro* suggèrent que les gènes en aval de ces séquences sont contrôlés par le répresseur transcriptionnel CebR. Bien que des analyses supplémentaires (RNAseq, RT-PCR,...) soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse, ces données préliminaires peuvent néanmoins nous permettre d'orienter nos perspectives de recherche.

#### 7.1.1 Le paradoxe de *S. scabies*

Bien que *S. scabies* ne semble pas pouvoir utiliser efficacement la cellulose (Johnson et al. 2007), son génome présente néanmoins de multiples enzymes impliquées dans la dégradation de ce polysaccharide (Lombard et al. 2014). On retrouve notamment des enzymes appartenant aux familles GH9, GH12, GH48 et GH74 qui ne sont généralement retrouvées que chez les *Streptomyces* présentant une forte activité cellulolytique (Book et al. 2016). Ce paradoxe est renforcé par l'abondance des *cbs* retrouvés chez *S. scabies*. En effet, une étude récente a montré une corrélation positive entre le nombre de *cbs* retrouvés chez différentes espèces de *Streptomyces* et leur capacité à hydrolyser la cellulose (Book et al. 2016). Or chez *S. scabies* nous avons identifié 20 *cbs* dont 14 se situent en amont de gènes codant pour des cellulases potentielles (Table 7). L'origine de ce paradoxe pourrait être que *S. scabies*, en recrutant CebR comme régulateur de sa pathogénicité, a adapté sa physiologie de manière à ne pas pouvoir générer lui-même les inducteurs de sa pathogénicité (cellobiose et cellotriose), tout du moins lorsqu'il n'est pas proche d'un hôte potentiel.

De manière intéressante, nous avons constaté que CebR contrôle plusieurs gènes de cellulases potentiellement indispensables à l'hydrolyse de la cellulose. En effet, on retrouve un *cbs* en amont du



**Figure 93: Vérification *in vitro* des interactions entre 6His-CebR et les *cbs* potentiels identifiés chez *S. scabies*.**

Fp: (free probe) sonde seule; R: sonde + 6His-CebR purifié; (Glc)<sub>2</sub>, sonde + 6His-CebR préincubé avec du cellobiose. Les sondes contiennent les *cbs* identifiés en amont de : ① *txtR-txtA*, ② *cebR-cebEFG* ; *scab90101 scab90061; scab90081; sca90091; scab89741; scab78881; scab51081; scab21081; scab17001-17011; scab16431<sup>#1</sup>; scab8871; scab5981; scab4961-4971*, ③ *txtB*, ④ *scab90101; scab82041-82031*, ⑤ *afsQ1afsQ2-sigQ*, ⑥ *scab85841*, ⑦ *bglC*, ⑧ *scab49071*, ⑨ *scab16431<sup>#2</sup>*, ⑩ *scab27461-27451*, ⑪ *scab23091*, ⑫ *scab13521-135231*.



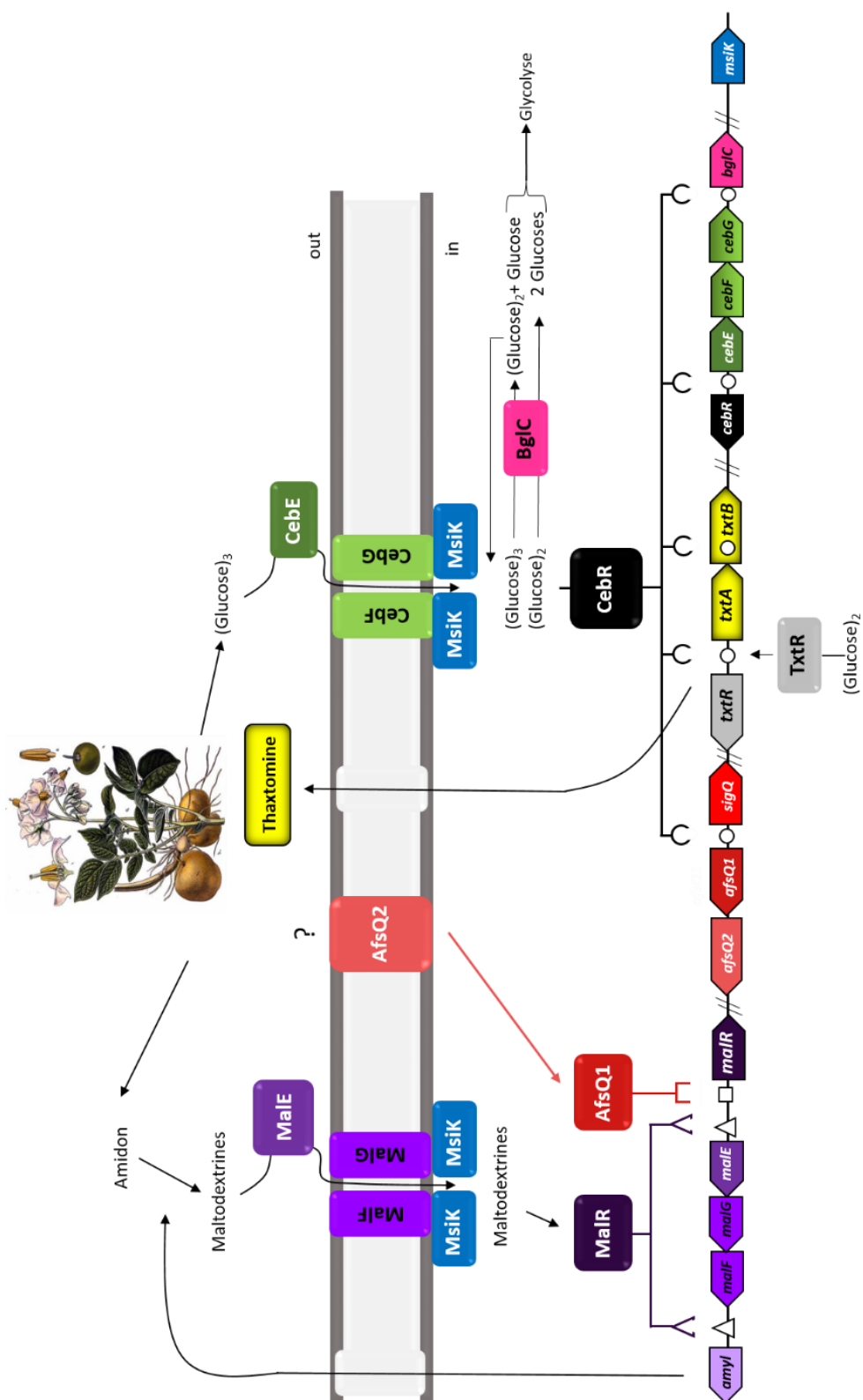
**Figure 94: Séquence consensus du *cbs* chez *S. scabies* et *S. griseus*.**

L'analyse des différents *cbs* identifiés et validés expérimentalement chez *S. griseus* (Marushima et al. 2009) et *S. scabies* indique que l'identité des acides nucléiques présents au centre de la séquence palindromique semble indispensable à l'interaction CebR-*cbs*. Au contraire, la substitution d'une (parfois deux) base extérieure du *cbs* ne semble pas empêcher CebR de s'y fixer. Ce Weblogo a été obtenu à partir des différentes séquences validées expérimentalement chez *S. scabies* et *S. griseus* (Weblogo généré à partir de *cbs* de séquences différentes).

gène codant pour l'unique GH9 présente chez *S. scabies*. Or, une étude a montré que la délétion de la seule GH9 du génome de *Clostridium phytofermentans* inhibe complètement l'hydrolyse de la cellulose par cette espèce bien que l'ensemble des autres cellulases soit toujours exprimées (Tolonen et al. 2009). Aussi, parmi les 4 GHs de la famille 6 identifiées dans le génome de *S. scabies*, 3 semblent contrôlées par CebR dont SCAB17001 et SCAB90101 qui présentent respectivement 75 % et 67 % d'identité (98 % et 92 % de recouvrement) avec la protéine SACTE\_0237 de la souche cellulolytique *Streptomyces sp.* SirexAA-E. Or la délétion de cette cellobiohydrolase SACTE\_0237 chez *Streptomyces sp.* SirexAA-E inhibe entièrement sa capacité à sécréter des protéines et à hydrolyser la cellulose (Book et al. 2016). Enfin, les deux LPMOs SCAB89741 et SCAB21081 (cette dernière est l'orthologue de CelS2 de *S. coelicolor*) prédites comme étant responsables de la dégradation de la cellulose cristalline chez *S. scabies* semblent également contrôlées par le régulateur CebR. L'ensemble de ces observations vient appuyer les résultats obtenus par Book et al qui démontrent que les fortes activités cellulolytiques chez les *Streptomyces* sont le résultat d'une série d'enzymes (endoglucanase, cellobiohydrolases et LPMOs) agissant en synergie, et que l'absence d'une de ces enzymes est suffisante pour diminuer drastiquement l'activité cellulolytique d'une espèce bactérienne (Book et al. 2016). Le contrôle de l'expression des différents gènes de cellulases énoncés ci-dessus ainsi que ceux des nombreuses autres cellulases (Table 7) dont les deux seules GH48 (généralisant du cellobiose) présentes dans le génome de *S. scabies*, suggère que CebR contrôlerait, en plus de l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine, la majeure partie du système cellulolytique chez ce phytopathogène.

De manière intéressante, nous avons constaté que la traduction de l'ARN messager de SCAB21081 (CelS2<sup>scab</sup>) est dépendante de *bldA* tandis que cela n'est pas le cas de ses orthologues chez *S. coelicolor*, *S. griseus* et *S. avermitilis*. A l'image des exemples que nous avons présentés ci-dessus, CelS2<sup>scab</sup> pourrait être une enzyme indispensable à l'activité cellulolytique chez *S. scabies*. Sur base du modèle que nous avons proposé à la Figure 92, cette dernière hypothèse suggère que l'expression du système cellulolytique de *S. scabies* pourrait être soumise aux mêmes contrôles (CebR et *bldA*) que les gènes de biosynthèse de thaxtamine. *S. scabies* pourrait donc avoir évolué de manière à exprimer son système cellulolytique parallèlement à la production de thaxtamine.

Bien que la majorité des gènes potentiellement contrôlés par CebR codent pour des protéines impliquées dans l'utilisation de la cellulose, d'autres semblent impliqués dans l'utilisation des hémicelluloses et des pectines (Table 7). Notons également que CebR contrôle l'expression de *scab90061* qui est une des deux enzymes de type expansine (CBM63) retrouvées chez *S. scabies* (voir introduction point 2.6.4.3). Ces constatations suggèrent que CebR contrôlerait également l'expression d'enzymes impliquées dans la dégradation des polymères de la paroi pectocellulosique et favoriserait ainsi la colonisation de l'hôte par *S. scabies*.



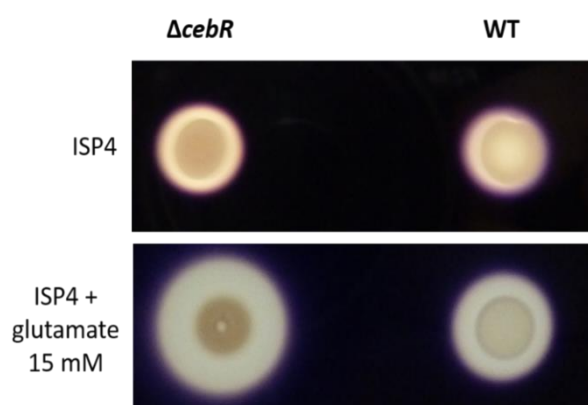
**Figure 95: Schéma des réseaux de régulations potentiels reliant CebR à l'utilisation de l'amidon.**

En présence de cellotriose (transporté *via* CebEFG-MsiK), le régulateur CebR ne serait plus capable de réprimer l'expression du TCS AfsQ1/Q2. En présence d'un signal extracellulaire spécifique, AfsQ2 entraînerait la phosphorylation du régulateur AfsQ1 qui activerait l'expression des gènes du transport des maltodextrines (MalEFG) et des alpha-amylases (*amyI*).

### 7.1.2 Le système à deux composants : AfsQ1/AfsQ2

La prédiction du régulon CebR chez *S. scabies* a permis d'identifier un *cbs* en amont des gènes codant pour le système à deux composants (TCS) AfsQ1/AfsQ2 (Table 7). Ce TCS est impliqué dans la différenciation morphologique et physiologique, mais également dans le métabolisme de l'azote chez *S. coelicolor* (R. Wang et al. 2013; Shu et al. 2009). AfsQ2 est une kinase membranaire qui perçoit un stimulus environnemental qui n'a toujours pas été clairement identifié (elle répond néanmoins à de grandes concentrations en glutamate) (R. Wang et al. 2013). AfsQ1 est un régulateur cytoplasmique pléiotrope capable de lier de nombreux sites répartis dans l'ensemble du génome. Il contrôle également l'expression du facteur sigma à fonction extracytoplasmique SigQ dont le gène est en divergeon par rapport à AfsQ1. A l'image de la plupart des régulateurs pléiotropes, les séquences de ses éléments de réponse sont très variables, c'est pourquoi la séquence consensus de ce régulateur chez *S. coelicolor* est restreinte à GTnAC-n<sub>6</sub>-GTnAC (où n peut être chacune des quatre bases azotées).

Après avoir validé le *cbs* en amont de l'opéron *afsQ1-afsQ2* par retard de migration électrophorétique (Figure 93), nous avons réalisé la prédiction du régulon d'AfsQ1 chez *S. scabies* sur base des séquences identifiées et validées expérimentalement chez *S. coelicolor* (R. Wang et al. 2013). PREDetector a notamment identifié deux sites de liaison potentiels d'AfsQ1 (GTcACgacgggGTaAC et cTtACatcgctGTtAC) dans la région promotrice du régulateur MalR. Or ce dernier est un répresseur transcriptionnel qui contrôle l'expression des gènes responsables de l'utilisation de l'amidon et des maltodextrines chez les *Streptomyces* (van Wezel et al. 1997). L'amidon étant le principal sucre de réserve chez les végétaux, il est tentant de postuler que l'expression du système amylolytique chez *S. scabies* serait sous le contrôle d'AfsQ1 et donc indirectement de CebR (Figure 95). L'analyse comparative de *S. scabies* et du mutant  $\Delta cebR$  en milieu ISP4 contenant du glutamate indique que la souche dépourvue du gène *cebR* présente, dans ces conditions, une activité amylolytique supérieure à celle de la souche sauvage (Figure 96). Bien que le lien entre CebR et MalR par l'intermédiaire d'AfsQ1 n'ait pas été démontré lors des premiers EMSAs, cette dernière expérience suggère toutefois l'existence d'un lien entre CebR et le système d'utilisation de l'amidon chez *S. scabies*.



**Figure 96 : Activités amylolytiques du mutant  $\Delta cebR$  et de la souche sauvage de *S. scabies*.**

Des spores du mutant  $\Delta cebR$  et de la souche sauvage de *S. scabies* sont déposées sur milieu gélosé ISP4 avec ou sans ajout de glutamate monosodique (15 mM). Après 48 heures de croissance à 28°C, la présence d'amidon est révélée par l'ajout d'une solution de lugol ( $I_2 + KI$ ). Les zones du milieu de culture contenant de l'amidon apparaissent alors en bleu foncé. L'ajout de 15 mM de glutamates entraîne chez les deux souches une augmentation de l'activité amylolytique (halos d'hydrolyse plus importants) par rapport au milieu dépourvu de cet acide aminé. Cependant, cette augmentation de l'activité amylolytique semble nettement plus marquée chez le mutant que chez la souche sauvage.

*cbs* parfait : TGGGAGCGCTCCCA  
*SCAB57831* : ctcac**c**GGGAGCGCTCCC**c**tgacg  
*SAV\_5261* : ctcac**c**GGGAGCGCTCCC**c**tgacg  
*SCO2792* : ctgac**g**GG**c**AGCGC**c**CC**g**c**c**cag  
*SGR\_4742* : ctcac**c**GG**c**AGCGC**a**CC**g**c**c**cag  
*STRS4\_01466* : ctgac**c**GG**c**AGCGC**c**CC**g**c**c**cag  
*SCLAV\_1957* : ctcac**c**GG**c**AG**t**GCTCC**g**c**c**cag

**Figure 97: Alignement des séquences des régions contenant le site potentiel de liaison de CebR dans la séquence codante des orthologues de *adpA/bldH* de différents *Streptomyces*.**

Les bases correspondant au *cbs* parfait sont en majuscules noires. Les nucléotides différant de la séquence palindromique parfaite du *cbs* sont en minuscules rouges. Les bases adjacentes au potentiel *cbs* sont en minuscules grises. Identifiants des gènes orthologues de *adpA/bldH* : SCAB : *S. scabies* ; SAV\_ : *S. avermitilis* ; SCO : *S. coelicolor* ; SGR\_ : *S. griseus* ; STRS4\_ : *Streptomyces S4* ; SCLAV\_ : *Streptomyces clavuligerus*.



**Figure 98: Phénotype du mutant  $\Delta cebR$  et de la souche sauvage de *S. scabies* sur milieu ISP4.**

Après 48 heures d'incubation à 28°C le mutant  $\Delta cebR$  a déclenché la formation des hyphes aériens (aspect blanc des colonies) ainsi que la production de thaxtomine (coloration jaune du milieu) contrairement à la souche sauvage (WT) qui est toujours au stade du mycélium végétatif.



**ΔcebR WT**



**ΔcebR WT**

**Figure 99: Phénotype du mutant  $\Delta cebR$  et de la souche sauvage de *S. scabies* sur milieu ISP7.**

Les photographies ont été prises après 48 heures d'incubation à 28°C. La vue du dessus permet d'observer que les deux souches se sont déjà différenciées en hyphes aériens tandis que la vue du dessous permet de visualiser la production de mélanine (pigment brun) chez le mutant  $\Delta cebR$  ( $\Delta cebR$ ) contrairement à la souche sauvage (WT) de *S. scabies*.



### 7.1.3 Le régulateur pléiotrope AdpA/BldH

Chez les *Streptomyces*, l'activateur transcriptionnel AdpA/BldH est un régulateur clé de la différenciation morphologique, mais s'est également révélé être impliqué dans la différenciation physiologique chez plusieurs espèces de ce genre bactérien (Chater et al. 2010; McCormick & Flärdh 2012). De manière intéressante, la prédiction du régulon CebR chez *S. scabies* nous a permis d'identifier un *cbs* potentiel (gGGGAGCGCTCCCg) en position + 818 dans la région codante du gène *adpA/bldH* (Table 8). Bien que la présence d'un élément de réponse dans une région codante ne soit pas habituelle, la validation *in vitro* de l'interaction entre CebR et le *cbs* identifié à l'intérieur de la région codante de *txtB* indique que cet élément *cis* pourrait être un site de liaison opérationnel du régulateur CebR. De plus, seules les deux bases extérieures de ce *cbs* potentiel diffèrent par rapport à la séquence palindromique parfaite reconnue par CebR. Or, la séquence consensus (Figure 94) indique que l'identité de ces deux bases extérieures n'a que peu d'influence sur l'interaction avec le régulateur. Une autre observation intéressante est que ce *cbs* potentiel est également retrouvé chez l'orthologue de *adpA/bldH* de *S. avermitilis* (Table 10), mais pas chez les orthologues des autres espèces de *Streptomyces* testées (Figure 97). Ensemble, ces observations suggèrent que CebR pourrait modifier l'expression du régulateur pléiotrope AdpA/BldH chez *S. scabies* et *S. avermitilis* et donc être impliqué dans les processus de différenciations morphologique et physiologique chez ces deux espèces.

De manière intéressante, plusieurs observations phénotypiques du mutant  $\Delta cebR$  tendent à confirmer l'implication du régulateur CebR dans le processus développemental de *S. scabies*. Effectivement, hormis les effets sur la production de thaxtomine et la virulence, nous avons constaté que la délétion du gène *cebR* chez *S. scabies* engendre des perturbations du développement morphologique et physiologique chez ce mutant par rapport à la souche sauvage. En effet, sur milieu solide ISP4 le mutant  $\Delta cebR$  déclenche son processus de différenciation morphologique (formation d'hyphes aériens) entre 30 et 40 heures après inoculation (Figure 98) tandis que l'apparition des hyphes aériens chez la souche sauvage n'a lieu qu'après 72 heures de culture. Cette accélération du développement chez le mutant  $\Delta cebR$  suggère que, dans ces conditions de culture, CebR contrôle directement ou indirectement l'expression de gènes impliqués dans le développement morphologique de *S. scabies*. Il est alors tentant de postuler que la présence d'un *cbs* potentiel dans le gène codant pour AdpA/BldH pourrait être à l'origine de ce phénotype. En effet, une hypothèse serait que l'absence du répresseur CebR entraînerait l'expression précoce d'AdpA/BldH chez le mutant  $\Delta cebR$  de *S. scabies*. Or, il a été démontré que le niveau intracellulaire d'AdpA/BldH affecte directement l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement chez *S. coelicolor* (Wolanski et al. 2011). Une autre caractéristique phénotypique du mutant  $\Delta cebR$  de *S. scabies* est sa capacité à produire constitutivement la mélanine en milieu solide ISP7 contrairement à la souche sauvage (Figure 99). Cette observation est extrêmement intéressante puisque chez plusieurs espèces de *Streptomyces*,

dont *S. avermitilis*, l'expression des gènes responsables de la production de mélanine est directement dépendante de la présence de l'activateur AdpA/BldH (Zhu et al. 2005; Zhao et al. 2007). Ainsi, de la même manière que suggérée ci-dessus, l'absence de CebR permettrait l'expression précoce de AdpA/BldH qui a son tour induirait l'expression des gènes de synthèse de la mélanine chez la souche  $\Delta cebR$  de *S. scabies*.

Ces deux observations phénotypiques tendent à démontrer que, sous certaines conditions de culture, le régulateur CebR est impliqué dans les différenciations morphologique et physiologique de *S. scabies*. A ce stade, il est bien évidemment prématuré d'attribuer les caractéristiques développementales du mutant  $\Delta cebR$  à la seule présence du potentiel *cbs* identifié au sein du gène codant pour AdpA/BldH. Effectivement, les effets de la délétion du gène *cebR* sur le développement de *S. scabies* semblent être directement dépendants du milieu de culture utilisé et donc de l'environnement nutritionnel de la bactérie. Notons que l'accélération du développement a lieu en milieu ISP4 dont l'unique source de carbone est l'amidon, ce qui renforce à nouveau l'idée qu'il existe un lien entre CebR et le polysaccharide de réserve des plantes. La validation par EMSA de l'interaction entre CebR et le *cbs* identifié au sein d'*adpA/bldH* ainsi que l'analyse transcriptomique comparative entre le mutant  $\Delta cebR$  et la souche sauvage de *S. scabies* en milieu ISP4 ou ISP7 permettront dans un premier temps d'évaluer le rôle du régulateur CebR dans l'expression de l'activateur pléiotropique AdpA/BldH. Puisque ce dernier est impliqué dans la production de thaxtomine et la virulence chez *S. scabies* (Dawn R D Bignell et al. 2014), s'il s'avère que CebR est capable de réprimer l'expression d'AdpA/BldH dans ces conditions de culture, cela signifierait qu'en plus de contrôler directement l'expression des gènes de biosynthèses de thaxtomine et du transporteur de l'inducteur, CebR contrôlerait également le taux d'AdpA/BldH et donc de *bldA* tous deux impliqués dans la production de thaxtomine chez *S. scabies*.

## 7.2 Prédiction du régulon CebR chez d'autres *Streptomyces*

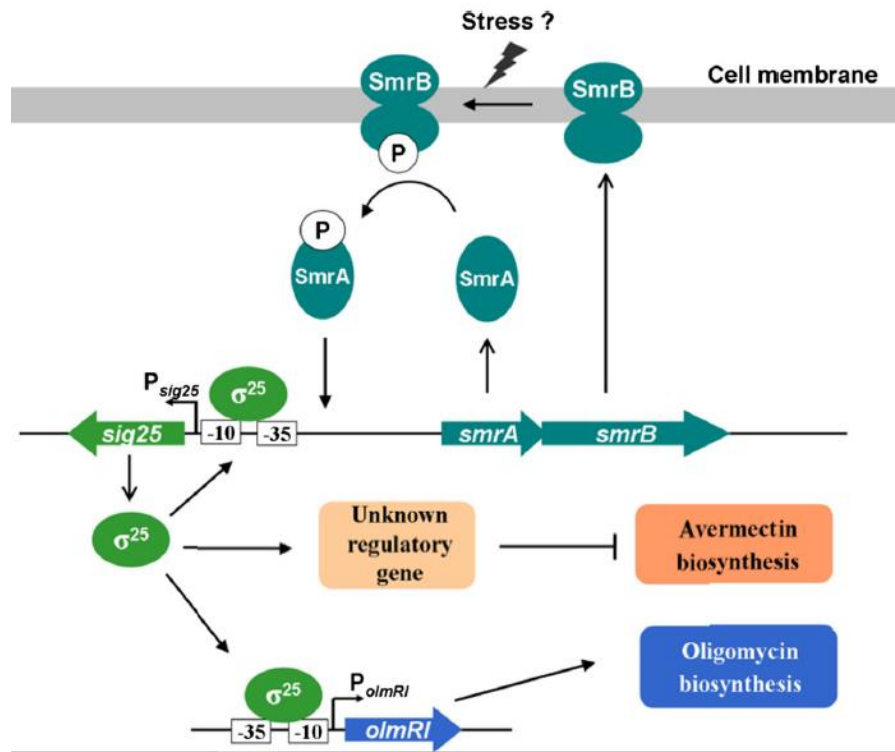
Bien que tous les *Streptomyces* évoluant dans le sol ne soient pas capables de dégrader efficacement la cellulose, ils possèdent généralement tous les gènes responsables de l'utilisation des produits de dégradation de ce polysaccharide: CebEFG-MsiK (Book et al. 2016). Par conséquent, ceux-ci possèdent également le répresseur transcriptionnel CebR. Bien que ce régulateur soit généralement décrit comme étant dédié au métabolisme primaire chez les *Streptomyces*, son contrôle de l'expression des gènes de biosynthèse de thaxtamine chez *S. scabies* nous a poussés à vérifier si d'autres espèces d'actinobactéries n'auraient pas également recruté ce régulateur pour contrôler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire. C'est pourquoi nous avons réalisé de nombreuses prédictions du régulon CebR chez diverses espèces de *Streptomyces* et autres *Actinobactéries* filamenteuses.

Étonnamment, ces prédictions nous ont permis d'identifier plusieurs *cbs* potentiels en amont de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire chez différentes espèces d'actinobactéries. Par exemple un *cbs* potentiel est retrouvé en amont (- 71 nt) d'un cluster de gènes de type PKS (*m271\_12950-12980*) chez *Streptomyces rapamycinicus*, ou encore en amont (- 189 nt) d'un cluster de gènes de type NRPS (*sros\_6842-6834*) chez *Streptosporangium roseum*. Ces prédictions bioinformatiques doivent bien évidemment être prises avec précaution, car aucune d'elle n'a été validée expérimentalement. Cette approche *in silico* et donc non onéreuse permet néanmoins d'orienter de futures recherches vers un échantillon d'espèces bactériennes parmi les milliers qui sont disponibles dans les banques de données. Nous présenterons ici l'exemple de la prédiction du régulon CebR chez *Streptomyces avermitilis* qui présente certaines homologues avec celle de *S. scabies*.

### 7.2.1 Prédiction du régulon CebR chez *Streptomyces avermitilis*

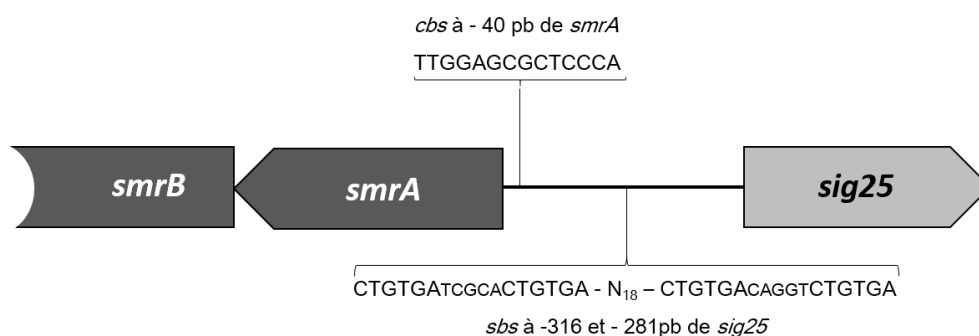
*Streptomyces avermitilis* est l'espèce bactérienne à partir de laquelle a été isolée la première avermectine par Satoshi Omura en 1975. Depuis, les avermectines ont permis de réduire l'incidence de nombreuses maladies parasitaires dont notamment l'onchocercose (ou cécité des rivières) qui touche des millions de personnes en Afrique et en Amérique centrale. La découverte des avermectines valut le prix Nobel de Physiologie ou de Médecine à Satoshi Omura et William C. Campbell en 2015 (partagé avec Tu Youyou pour ses travaux sur le paludisme). Aujourd'hui, ce puissant antihelminthique est le biopesticide le plus vendu à travers le monde (Chen et al. 2016).

Étant donné l'impact économique de l'avermectine, de nombreuses études ont été menées afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la production de ce métabolite secondaire chez *S. avermitilis* (Chen et al. 2016). Ces mécanismes font notamment intervenir le TCS SmrA/SmrB et le facteur sigma (ECF-SF) Sig25 (Luo et al. 2014) qui sont les homologues de AfsQ1/AfsQ2-SigQ



**Figure 100: Modèle de la régulation par SmrAB-Sig25 de la production d'avermectine et d'oligomycine chez *S. avermitilis*.**

Brièvement, la kinase membranaire SmrB entraîne la phosphorylation du régulateur SmrA suite à la perception d'un signal environnemental encore inconnu. Une fois phosphorylé, SmrA active la transcription de l'ECF-SF Sig25. Une fois recruté par une ARN polymérase, Sig25 permettra i) sa propre transcription, ii) l'expression de l'activateur transcriptionnel de OlmRI responsable de l'expression des gènes de biosynthèse de l'oligomycine, et iii) la transcription d'autres régulateurs transcriptionnels réprimant directement ou indirectement l'expression de l'activateur transcriptionnel AveR responsable de l'expression des gènes de biosynthèse de l'avermectine (Luo et al. 2014).

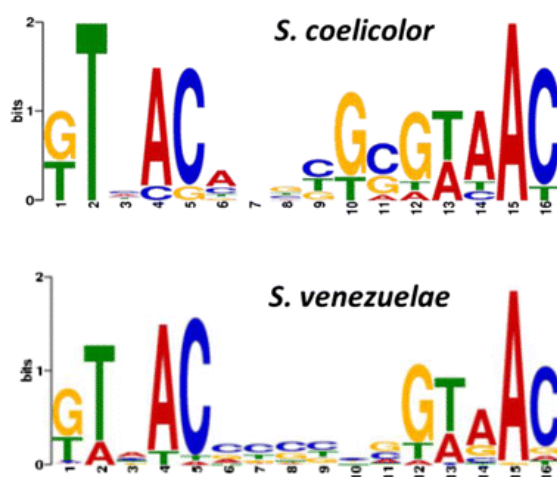


**Figure 101: Position des éléments *cis* identifiés entre *smrA* et *sig25* chez *S. avermitilis***

Position des éléments *cis* reconnus par SmrA (*sbs*) et du potentiel *cbs* identifié à l'aide de PREDetector dans la région intergénique entre *smrA* et *sig25* chez *S. avermitilis*. Les sites de fixation de SmrA sont constitués de deux séquences répétées conservées (CTGTGA) espacées de 5 nucléotides aléatoires.

identifiés chez *S. coelicolor* et *S. scabies*. En effet, l'expression de Sig25 chez *S. avermitilis* entraîne à la fois l'inhibition de la production d'ivermectine et l'activation de la production d'oligomycine (Figure 100). L'oligomycine est un métabolite secondaire qui présente des activités antifongique, antitumorale et nématocide, mais est généralement peu produit chez *S. avermitilis* (Luo et al. 2014).

La prédiction du régulon CebR chez *S. avermitilis* nous a notamment permis d'identifier un *cbs* potentiel 40 pb en amont de l'opéron *smrAB* (Table 9). La position de ce *cbs* par rapport aux deux sites de fixation de SmrA dans la région intergénique entre *sig25* et *smrAB* suggère que CebR pourrait directement réprimer l'expression de *smrAB* (Figure 101). Puisque ce TCS contrôle directement l'expression de Sig25 et que ce dernier entraîne l'inhibition de la production d'ivermectine au profit de la production d'oligomycine, la présence de CebR favoriserait la production d'ivermectine chez *S. avermitilis*. De la même manière, cela signifie que *S. avermitilis* ne pourrait produire de l'oligomycine qu'en présence de l'effecteur allostérique de CebR et du stimulus nécessaire à la phosphorylation de SmrB. Étant donné les activités biologiques que présentent l'ivermectine et l'oligomycine, le contrôle de la production de ces deux métabolites par CebR pourrait avoir une signification biologique très importante. En effet, il est tentant d'imaginer que *S. avermitilis* pourrait, comme *S. scabies*, avoir recruté CebR comme régulateur de la production de deux métabolites secondaires pouvant lui donner un avantage considérable au sein de certaines niches écologiques et pourquoi pas en tant que symbionte avec d'autres organismes.



(Yao et al. 2014)

Figure 102: Weblogo obtenu à partir des séquences reconnues par le régulateur GlnR chez *S. coelicolor* et *S. venezuelae*.

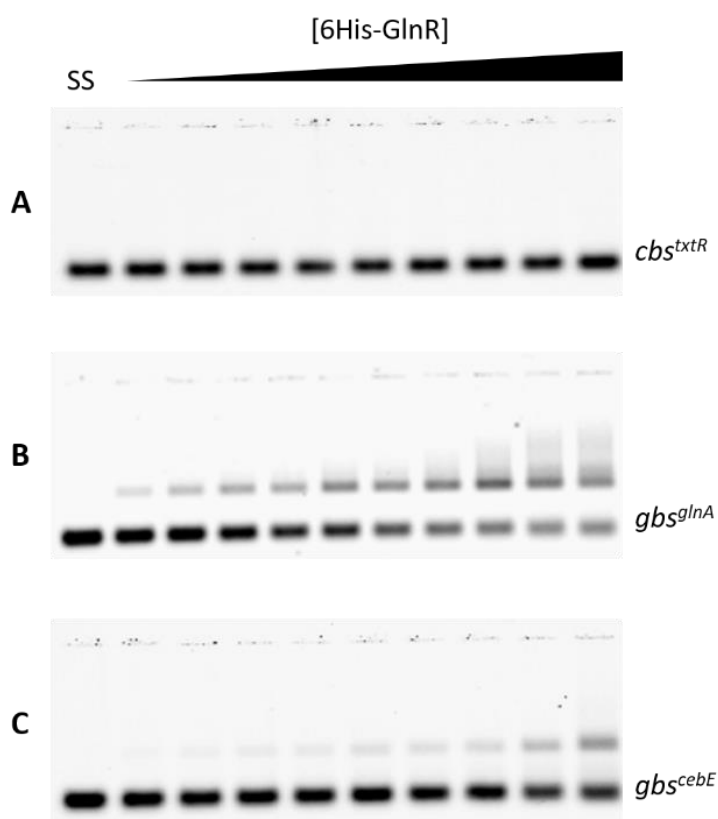


Figure 103: Validation de l'interaction entre GlnR et le *gbs* identifié en amont de *cebE*.

EMSAs réalisés entre la protéine 6His-GlnR purifiée et : (A) la sonde *cbs<sup>txtR</sup>* (témoin négatif), (B) la sonde *gbs<sup>glnA</sup>* (témoin positif) et (C) la sonde *gbs<sup>cebE</sup>* contenant le site potentiel identifié en amont de l'opéron *cebEFG*.

### 7.3 Autres régulateurs potentiellement impliqués dans la pathogénicité chez *Streptomyces scabies*

Étant donné l'abondance des facteurs de transcription ainsi que la complexité des systèmes de régulation chez les *Streptomyces* (McCormick & Flärdh 2012; Romero-Rodríguez et al. 2015), nous avons réalisé la prédiction, chez *S. scabies*, des régulons de différents régulateurs transcriptionnels caractérisés chez les *Actinomyces* afin d'évaluer leurs implications potentielles dans la pathogénicité chez *S. scabies*. Nous présenterons ci-dessous le cas du régulateur GlnR.

#### 7.3.1 Le régulateur GlnR

GlnR est un régulateur global du métabolisme de l'azote chez les actinobactéries. En effet, chez *Streptomyces venezuelae*, *S. coelicolor* et *Saccharopolyspora erythraea*, ce régulateur contrôle l'expression des gènes impliqués dans la perception et l'utilisation des différentes sources d'azote (Tiffert et al. 2008b; Pullan et al. 2011; Yao et al. 2014). Cependant, une étude récente a démontré que ce régulateur transcriptionnel est également impliqué dans l'utilisation des sources de carbone chez *Saccharopolyspora erythraea* (Liao et al. 2015). En effet, GlnR est capable d'activer la transcription de 13 des 20 ABC transporteurs responsables du transport de différents sucres chez *S. erythraea*. De plus, la prédiction du régulon GlnR chez d'autres actinomycètes tels que *Mycobacterium smegmatis*, *Amycolatopsis mediterranei*, *S. venezuelae*, *S. avermitilis* et *S. coelicolor* a également permis d'identifier de nombreux *gbs* (pour GlnR-binding site) en amont de gènes codant pour des ABC transporteurs impliqués dans l'utilisation de différents sucres chez ces espèces. En contrôlant directement l'expression de ces gènes, le régulateur GlnR pourrait donc réguler l'utilisation de nombreux sucres (non dépendant du PTS) chez les actinomycètes (Liao et al. 2015).

Les séquences des *gbs* identifiés chez *S. coelicolor* et *S. venezuelae* divergent fortement et rendent les prédictions du régulon GlnR chez d'autres espèces plus difficiles à interpréter. La prédiction du régulon GlnR chez *S. scabies* nous a néanmoins permis d'identifier un potentiel *gbs* en amont de l'opéron *cebEFG* (*gbs<sup>cebE</sup>*). En effet, la séquence de *gbs<sup>cebE</sup>* (TTAACAGCCCGATAAC) présente une bonne identité avec les séquences consensus déduites des *gbs* validés expérimentalement chez les autres *Streptomyces* (Figure 102) (Tiffert et al. 2008b; Pullan et al. 2011). Les expériences de retard de migration électrophorétique menées en présence de *gbs<sup>cebE</sup>* et le régulateur GlnR de *S. scabies* indiquent que ce régulateur est capable de lier cet élément de réponse (Figure 103). Ces résultats préliminaires suggèrent que, chez *S. scabies*, le régulateur GlnR pourrait activer la transcription de *cebEFG* et donc participer au transport des inducteurs de la pathogénicité en fonction des disponibilités en azote de la bactérie.

La prédiction du régulon GlnR chez *S. scabies* nous a également permis d'identifier un potentiel *gbs* (GTCACGACGGGGTAAC) en amont de l'opéron *malEFG* responsable du transport des produits de dégradation de l'amidon. La présence d'un *gbs* en amont de *malEFG* a déjà été observée chez d'autres *Streptomyces* (Liao et al. 2015). En effet, Liao et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré que la transcription de *malEFG* ainsi que le transport de maltose chez *S. coelicolor* et *S. avermitilis* sont dépendants de la présence de l'activateur GlnR (Liao et al. 2015).

Ce contrôle potentiel de GlnR sur les transporteurs des maltodextrines et des cellooligosaccharides chez *S. scabies* n'est pas sans rappeler le lien potentiel CebR-AfsQ1-MalR évoqué précédemment (Figure 95). Il est également intéressant de constater que chez *S. coelicolor*, AfsQ1 et GlnR contrôlent tous deux l'utilisation des sources d'azote, et partagent également certains promoteurs (R. Wang et al. 2013). Quoi qu'il en soit, l'implication des sources d'azote dans l'utilisation des cellooligosaccharides et des maltodextrines et donc potentiellement dans la pathogénicité de *S. scabies* est une thématique intéressante qui mérite de futures investigations.



## 8 Matériel et methods

### 8.1 Bacterial strains, media, chemicals, and culture conditions

All strains and plasmids used in this study are described at the end of this chapter in Table 5 (page 184).

*Escherichia coli* strains were cultured in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C in a New Brunswick agitator rotating at 250 rpm or in static incubator in solid agar plates. *E. coli* strains can be stored at -70°C for an extended period of time.

*Streptomyces* strains were grown at 28°C either in liquid media in a New Brunswick agitator rotating at 180 rpm or in static incubator in solid agar plates. Liquid and solid media are inoculated with a suspension of spores or of mycelium.

*Streptomyces* can be stored in a spore suspension. To do this, *Streptomyces scabies* strains are grown in ISP4 or ISP2 agar plates during one weeks at 28°C. 10 mL of sterile water are poured onto plates and spores are scraped with sterile cotton buds. The suspension is then vortexed and filtered on a syringe containing sterile cotton in order to eliminate remaining mycelium fragments. Spores are finally pelleted by centrifugation and resuspended in 20% of glycerol (v/v) and stored at -20°C or -70°C for extended periods of conservation. Spores suspension concentrations were determined by counting after dilution series and 10<sup>7</sup> spores per plate are necessary to obtain confluent culture on solid media.

When required, the medium was supplemented with the antibiotics ampicilline (100 µg/mL) apramycin (50 µg/mL), kanamycin (50 µg/mL), chloramphenicol (30 µg/mL), thiostrepton (25 µg/mL), and/or nalidixic acid (50 µg/mL). Cellobiose and cellooligosaccharides were purchased at Megazyme (Ireland).

#### Media composition (for 1 liter)

**LB:** tryptone (10 g), yeast extract (5 g), NaCl (10 g), agar (15 g), pH 7.0

**SOC:** tryptone (20 g), yeast extract (5 g), NaCl (0.6 g), KCl (1.9 g), MgCl<sub>2</sub> (2 g), MgSO<sub>4</sub> (2.5 g) and glucose (4 g)

**TSB:** tryptone (17 g), soytone (3 g), NaCl (5 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.5 g), glucose (2.5 g), pH 7.3

**ISP2:** yeast extract (4 g), malt extract (10 g), dextrose (4 g), agar (20 g), pH 7.2

**ISP4:** soluble starch (10 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 g), NaCl (1 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g), CaCO<sub>3</sub> (2 g), agar (20 g), pH 7.2

**ISP7:** glycérol (15 g), L-asparagine (1 g), L-tyrosine (0.5 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g), NaCl (0.5 g), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01 g), agar (20 g), pH 7.3

**Trace elements for ISP media (for 100 mL):**

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.64 g), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.11 g), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.79 g), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.15 g)

**TDM:**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g), MgSO<sub>4</sub> (0.6 g), 600 mL H<sub>2</sub>O.

Add at time of use: Minor elements (1 mL) (filter sterilized), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26 g/L pH 7.2 (100 mL) (autoclaved), Cellobiose 7 % (TDMc) or H<sub>2</sub>O (100mL) (autoclaved), Xylose 5 % (TDMx) or H<sub>2</sub>O (200 mL) (autoclaved).

**Minor elements for TDM media (for 100 mL, filter sterilized):**

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.1 g), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.1 g), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.1 g), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.1 g)

**Minimal media (MM):**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2 g), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g), agar (10 g), pH 7.0 - 7.2 (Kieser et al. 2000)

**OBB/OBA:** 20 g of oat bran. Transfer to large beaker with 500 mL distilled water, heat in microwave at full power until it is boiling. Reduce power to P-10 and continue heating for 20 min. Place on stir plate and let the mixture cool slowly while stirring for 60 min. Filter through cheese cloth (4 single layers) in a Büchner funnel (if necessary draw the liquid through with low vacuum) into a sidearm flask. Wash the oats with around 300 mL distilled water (if necessary draw the liquid through with low vacuum). Rinse the beaker. Pool the broth into the rinsed beaker and adjust the pH of the broth to 7.2 with 1 M NaOH. Add 2 mL of trace element solution (see below). Add distilled water to bring the total volume to 1 l. For OBB agar add 15 g of agar/L of broth before autoclaving,

**Trace elements solution for OBB/OBA (1L):** 40 mg ZnCl<sub>2</sub>, 200 mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O.

## 8.2 Molecular biology experiments

### 8.2.1 Gene amplification by PCR

The PCR were performed with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase Sample Pack (New England BioLabs inc., Canada). PCR protocol is summarized below. Oligonucleotides used are listed in Table 6 (page185).

Mix	Temperature		Time
- 5X Q5 Reaction buffer : 10 µL - Forward primers (100 µM) : 0.5 µL - Reverse primers (100 µM) : 0.5 µL - dNTPs (10 mM): 1 µL - Genomic DNA : between 1 et 25 ng - Q5 High-Fidelity : 0.5 µL - 5X Q5 High GC Enhancer : 10 µL Nuclease-Free Water : up to 50 µL	Initial denaturation : 98°C		30 seconds
	25-35 cycles	Denaturation : 98°C	5-10 seconds
		Annealing : 50-72°C*	10-30 seconds
		Extension : 72°C	20-30 seconds/kb
	Final extension : 72°C		2 minutes

\*The annealing temperature depends on the primer T<sub>m</sub> (melting temperature).

### **8.2.2 pJET1.2/blunt cloning**

Ligation in pJET1.2/blunt (Fermentas) was performed according to the manufacturer's instructions. 2 µL of the purified PCR product was added to 1 µL of the plasmid, 1 µL T4 DNA ligase, 10 µL 2X ligation buffer, and 6 µL of sterile distilled water. The reaction mix was gently mixed and incubated for 30 minutes at room temperature or over night from 4 to 16°C. 5 to 10 µL of the ligation reaction mix was used to transform *E. coli* DH5α competent cells by heat shock (see point 8.2.4). Transformed colonies were selected with ampicillin in LB agar plates.

### **8.2.3 Restriction endonuclease digestion and ligation**

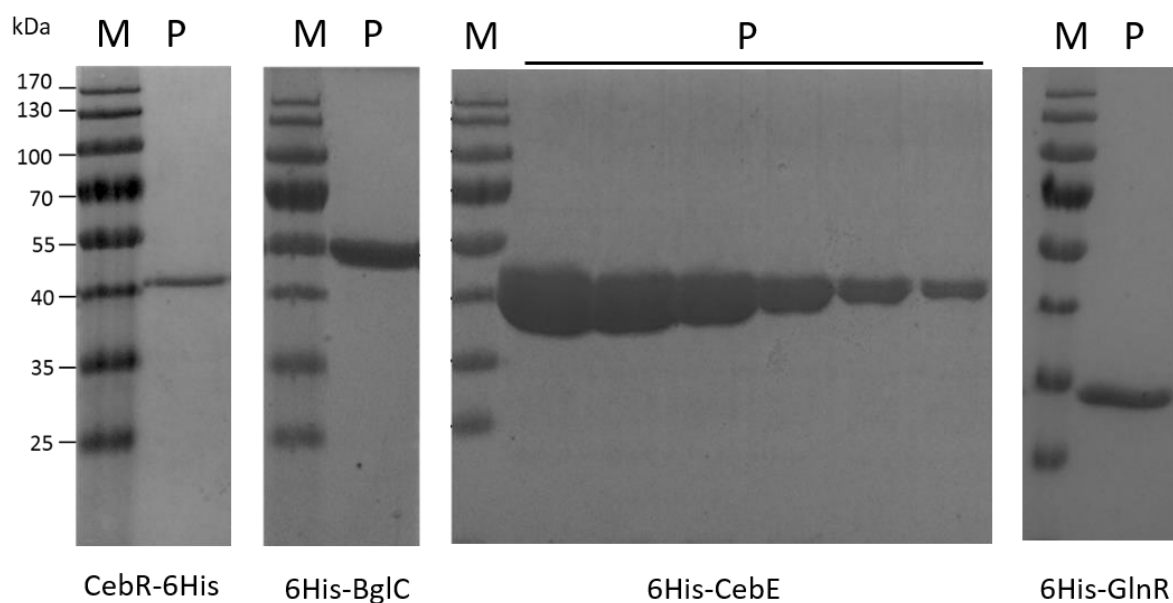
Restriction enzymes were used according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Digested vector and insert were purified using a gel band purification kit (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol and used in 1/3 molar ratio in the ligation reaction mix. The DNA concentration of the purified digested fragments was assessed using a NanoVue™ (GE Healthcare) at 260 nm.

The reaction mix (20 µL) containing digested vector, insert, T4 ligase buffer and 1 unit of the T4 ligase (Fermentas) was incubated over night from 4 to 16°C. 5 to 10 µL of the ligation reaction mix were used to transform *E. coli* DH5α or *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta competent cells by heat shock.

### **8.2.4 *E. coli* competent cell preparation and transformation**

A fresh colony of *E. coli* strain (DH5α or *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta) is used to inoculate 3 mL of LB. The resulting overnight preculture serves as the inoculum for 50 mL LB culture grown until the optic densitometry at 600 nm reaches 0.6. The culture is then cooled on ice for 20 minutes and subsequently centrifuged. The pelleted cells are gently resuspended in 40 mL of cold 100 mM CaCl<sub>2</sub> and left on ice for 30 minutes before a series of centrifugation/resuspension steps with 15 mL of cold 100 mM CaCl<sub>2</sub>. The cell pellet is then resuspended in 1 mL of cold 100 mM CaCl<sub>2</sub> and incubated one night at 4°C. Cells are finally resuspended in LB with 20 % glycerol and 100 µL aliquots are stored at -70°C.

The ligation mix is added to 100 µL of competent cells and is then incubated for 30 minutes on ice. The cells are then subjected to a 45 seconds heat shock at 42°C and immediately cooled on ice. 500 µL of SCO media is added to the cells which are then incubated for 1 to 2 h at 37°C before being plated on LB agar plate with specific antibiotics.



**Figure 104 : SDS-PAGE showing the level of purity of His<sub>6</sub>-tagged proteins used in this thesis.**

Lane P, the predicted migration size of the bands correspond well to the calculated size of His<sub>6</sub>-tagged proteins (CebR-6His: 40206 Da, 6His-BglC: 54121 Da, 6His-CebE: 45423 Da and 6His-GlnR: 29715 Da). Lane 1, molecular weight markers (Fermentas). The protein identification was performed by liquid chromatography-electrospray ionization (LQ-ESI)-tandem mass spectrometry. The band was excised from the SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue and reduced, alkylated, and digested within the gel slice using trypsin. The protein digest was independently analyzed on a liquid chromatograph (nano-Ultimate 3000; Dionex)-ESI ion trap (amaZon speed electron transfer dissociation; Bruker Daltonics) in positive-ion mode. Spectra were interpreted using data analysis version 4.0 (Bruker). Database searches were performed using the Mascot server version 2/2/04 and protein Scape version 3.0 (Bruker) with the NCBI database (restricted to bacterial taxonomies).

### 8.3 Proteins production and purification

The open reading frame (ORF) encoding the targeted protein was amplified by PCR using the primers listed in Table 6 (page 185). The corresponding PCR product was subsequently cloned into the pJET1.2/blunt cloning vector. After DNA sequencing, a restriction DNA fragment was excised from the recombinant vector and cloned into pET (22b or 28a see Table 5) digested with the same restriction enzymes. *E. coli* Rosetta (DE3) competent cells were transformed with the resulting construct (pSAJxxx, see Table 5 page 184). *E. coli* cells carrying pSAJxxx were grown at 37°C in 250 mL LB medium containing the required antibiotics until the culture reached an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.6. Production of His<sub>6</sub>-tagged protein was induced overnight (~20 h) at 16°C by addition of 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. Cells were collected by centrifugation and ruptured by sonication in lysis buffer (100 mM Tris-HCl buffer; pH 7.5; 250 mM NaCl; 20 mM imidazole supplemented with the EDTA-free cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche), for CebR-6His purification NaCl and imidazole were removed from the buffer. Soluble proteins were loaded onto a preequilibrated Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose column (5-mL bed volume), and recombinant protein was eluted with imidazole. CebR-6His, 6His-CebE, 6His-BglC and 6His-GlnR started to be eluted at around 150 mM, 90 mM, 100 mM and 240 mM imidazole, respectively. Fractions containing the pure protein were pooled (Figure 104) and desalted using a HiTrap desalting column (GE Healthcare) with 20 mM Tris-HCl buffer (CebR-6His) or were dialyzed overnight in 30 mM Tris-HCl buffer; pH 7.5; 150 mM NaCl (6His-CebE and 6His-GlnR) or in 50 mM HEPES; pH 7.5 (6His-BglC)

### 8.4 Protein-ligand interaction assays

#### 8.4.1 Tryptophan Intrinsic fluorescence assays

Pure 6His-CebE was dissolved in a 12 mM Tris-HCl buffer pH 7.5; 40 mM NaCl to a final concentration of 180 nM and analyzed at room temperature by a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Ltd). Measurements were performed with 1 mL of sample mix in a 10 mm path quartz cuvette with an excitation wavelength of 280 nm. Each emission fluorescence spectrum is the mean of 10 scans acquisitions between 300 and 400 nm at a speed of 600 nm/minute. Excitation and emission slit lengths were 5 and 10 nm respectively. The potential difference of the photomultiplier was fixed at 750 V. To assess the binding ability of different sugars to 6His-CebE, we first compared the fluorescence emission spectra of the pure 6His-CebE (180 nM) with or without 30  $\mu$ M glucose, maltose, trehalose, cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, or cellohexaose.

Determining of dissociation constants ( $K_D$ ) from fluorescence data:

Samples used to determine the dissociation constants ( $K_D$ ) were prepared and analyzed as described above with 25 different concentrations (ranging from 15 nM to 500 nM) of cellobiose or cellotriose. Fluorescence assays were performed with six different preparations of pure 6His-CebE protein. The proportion of 6His-CebE bound to cello-oligosaccharide was calculated using the following equation:

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_{\max}} \quad (1)$$

where  $F_0$  is the fluorescence intensity of the free 6His-CebE protein,  $F$  is the fluorescence of 6His-CebE in the presence of a given cello-oligosaccharide concentration, and  $F_{\max}$  is the fluorescence of 6His-CebE in the presence of excess sugar (saturating conditions).

These data were introduced in the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) and the following nonlinear curve fitting function was used to find the dissociation constant  $K_D$  using equation (2):

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_{\max}} = \frac{K_D + [Pt] + [St] - \sqrt{(K_D + [Pt] + [St])^2 - 4[Pt][St]}}{2[Pt]} \quad (2)$$

In which  $[Pt]$  is the total 6His-CebE concentration and  $[St]$  is the total sugar (cello-oligosaccharide) concentration.

#### 8.4.2 EMSAs

EMSAs with double-stranded probes (Table 6 page 185) were performed using Cy5-labeled probes mainly as described previously (Swiatek et al. 2012). *cbs* probes (6 nM or 30 nM final concentration) and CebR-His<sub>6</sub> at a final concentration of 0.08 to 3.2  $\mu$ M were mixed in a total reaction volume of 50  $\mu$ l. All reactions were carried out in EMSA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, and 2% glycerol) containing an excess of nonspecific salmon sperm DNA. An EMSA with a Cy5-labeled probe containing the DasR-responsive element upstream of *dasA* (Colson et al. 2008) and CebR-His<sub>6</sub> was performed as a negative control (data not shown). EMSA reactions were loaded into a 1% (w/v) agarose gel and bound and unbound probes were separated by gel electrophoresis at room temperature. Fluorescent Cy5-labelled DNA was visualized using a Typhoon Trio+ Variable Mode Imager (GE Healthcare, laser excitation at 633 nm and emission filter at 670 nm (BP30)).

### 8.4.3 $\beta$ -glucosidase assays

#### 8.4.3.1 $\beta$ -glucosidase activity assays

Relative enzyme activity was determined using *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-NP $\beta$ G) as substrate. The reaction mixture (200  $\mu$ L) containing 50 mM HEPES buffer (pH 7.5), 0.2  $\mu$ M of purified BglC and the tested reagent was incubated 10 minutes at 25°C before addition of 1 mM *p*-NP $\beta$ G. The reaction was carried out at 25°C for 2 minutes and stopped by addition of 100  $\mu$ L of 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. All assays were performed under these conditions, unless otherwise indicated. The release of *p*-nitrophenol (*p*-NP) was measured at 405 nm with a TECAN infinite® 200 PRO. The activity assayed in absence of the tested reagent was recorded as 100%.

#### 8.4.3.2 Temperature and pH

The optimal temperature was determined by measuring the relative enzyme activity of BglC in HEPES 50 mM pH 7.5 at 20, 25, 30, 37 and 42 °C. To measure the effect of pH on activity of BglC, relative activity was assayed in the range of pH 5.0 - 6.5 (50 mM MES buffer), pH 7.0 – 8.5 (50 mM HEPES buffer) and pH 9 – 10 (50 mM CHES buffer) at 25°C.

#### 8.4.3.3 Substrate specificity

The cleavage ability of BglC was tested against different cello-oligosaccharides (cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose and cellohexaose (Megazyme; Ireland) or different disaccharides (lactose, saccharose, maltose, threalose and turanose). Reaction mixtures (100  $\mu$ L) containing 50 mM HEPES buffer pH 7.5; 0.4  $\mu$ M of purified BglC; 6.25 mM of cello-oligosaccharides or 12.5 mM of disaccharides were incubated at 30 °C. 15  $\mu$ L of each sample were collected at 0, 15, 30 and 60 min than heated at 98°C for 5 min to stop the reaction. Each sample was spotted onto aluminum-backed Silica gel plate (Sigma). The plates were developed with chloroform-methanol-acetic acid-water solvent (50:50:15:5, vol/vol), air dried, dipped in 5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol and finally heated over a hot plate until visualization of carbohydrate spots exactly as described by Gao *et al* 2014.

#### 8.4.3.4 Kinetic analysis

##### With cellobiose as substrate

Kinetic parameters of BglC (*K<sub>m</sub>*, *k<sub>cat</sub>*, *V<sub>max</sub>*) with cellobiose as substrate were determined by measuring the glucose released at various cellobiose concentrations in 50 mM HEPES buffer pH 7.5 at 26°C. Reaction times were chosen to ensure initial rates of hydrolysis. Glucose concentrations were determined using the D-Glucose HK Assay Kit from Megazyme (Ireland). Data were fitted to the Henri-Michaelis-Menten equation using the GraphPad Prism 5 software.

### With pNPβG as substrate

Kinetic parameters of BglC ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $V_{max}$ ) with pNPβG as substrate were determined by measuring the *p*-NP released at various pNPβG concentrations (from 10 to 1500 μM) in 50 mM HEPES buffer pH 7.5 at 26°C. Reaction times were chosen to ensure initial rates of hydrolysis. *p*-NP concentrations were determined by measuring optical density at 405 nm with a microplate reader Infinite 200 PRO (Tecan). Since BglC is inhibited by pNPβG, data were fitted to the substrate inhibition equation (see below)(Copeland 2000) using the GraphPad Prism 7.01 software.

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(K_m + [S] \cdot (\frac{1 + [S]}{K_i}))}$$

### Substrate inhibition equation where:

$V_0$  is the initial enzyme velocity

$[S]$  is the initial pNPβG concentration

$V_{max}$  is the maximum enzyme velocity, if the substrate didn't also inhibit enzyme activity, expressed in the same units as  $V_0$ .

$K_m$  is the Michaelis-Menten constant, expressed in the same units as  $[S]$ .

$K_i$  is the dissociation constant for substrate binding in such a way that two substrates can bind to an enzyme. It is expressed in the same units as  $[S]$ .

### 8.4.3.5 Dynamics of cellobiose or cellotriose concentrations in the culture supernatants of *Streptomyces scabies* 87-22.

Mycelia grown in 25 mL liquid ISP2 medium for 24 hours were washed three times then suspended in 50 mL minimal media supplemented with 250 μM cellobiose or cellotriose at time zero. The suspension was further incubated at 28°C with shaking for 11 hours. Both cultures were periodically sampled (700 μL each hour) and centrifuged 10 minutes at 4°C at full speed. 250 μL of the supernatant of each sample (kept at 4°C for 24h before analysis) were supplemented with 4 mM *p*-NPβG. BG activity was measured as explained before (point 8.4.3.1). Cellobiose and cellotriose quantification in the remaining supernatants (filtered through 0.45 μm PVDF filter and kept at – 20°C before analysis) was performed by HPLC on an Aminex HPX-87P Column (300 x 7.8 mm) heated to 80°C with H<sub>2</sub>O as eluent (flow rate 0.6 mL/min). Peaks were detected by refractive index detector (Waters 2414).

### Intracellular BG activity assays

The pellet of each sample (kept at -20°C before analysis) was resuspended in 100 μL of 100 mM HEPES buffer (pH 7.5) then sonicated 10 cycles of 30 seconds on/30 seconds off with a Bioruptor® Plus (Diagenode). Lysate was centrifuged 10 minutes at 4°C at full speed. 95 μL of the supernatant were



supplemented with *p*-NPβG and BG activity were measured as explain before (point 8.4.3.1). Value obtained was reported to the total proteins concentration of the analyzed sample.

#### **8.4.3.6 BglC production yield assays with a commercialized cellulolytic enzymes mixture**

Experiments were performed with 10 %w/v Avicel pH101 (Fluka) dissolved in 100 mM HEPES buffer (pH 7.5, 100 mM) or acetate buffer (pH 4.5, 100mM) for the DELTAGAS®AT-150 or DELTAZYME®AT-150 assays, respectively. Commercialized cellulolytic enzymes mixtures were used at a concentration of 0.2 g per gram of Avicel as recommended by supplier. When added, purified 6His-BglC was at a final concentration of 5 μM. Each assay was performed in a final volume of 4 mL and incubated at 38°C in a 12 mL plastic tube on a rotary shaker. Glucose concentrations were measured after 6, 24, 48 and 72 hours of incubation with the D-Glucose HK Assay Kit from Megazyme (Ireland).

DELTAGAS®AT-150 and DELTAZYME®AT-150 enzymes mixtures were kindly provided by Dr. Johannes de Bie from WeissBioTech GmbH company.

### **8.5 Targeted proteomic analysis**

*S. scabiei* 87-22 and its *cebR* null mutant were grown on ISP-4 plates with or without a 0.7% cellobiose supply. The mycelium was collected after 48 hours of incubation at 28°C, suspended in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (pH 7.5) and crude intracellular extracts were obtained after sonication of the mycelium as described previously (Tenconi et al. 2013) Sample preparation for Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring (LC-MRM) analysis, and LC-MS<sup>E</sup> analysis were performed as previously described (Devos et al. 2015) and fully detailed below.

#### **LC-MS<sup>E</sup> analysis**

The protein lysate was mixed with 100% (w/v) TCA solution (Sigma-Aldrich) (4:1). The extract was then centrifuged at 16,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was washed twice with ice-cold acetone (Sigma-Aldrich). After each washing step the pellet was recovered by centrifugation at 16,000 x g for 30 min at 4°C. The resulting pellet was solubilized in 50 mM ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich) containing 2 M urea (GE Healthcare). The protein concentration was assessed by Bradford analysis using the Pierce<sup>TM</sup> Coomassie Protein Assay Kit. Protein solutions (10 μg) were subsequently reduced, alkylated and digested with trypsin (Promega) overnight (1:50 w/w). Digested samples were dried and dissolved in 50 μl 20mM ammonium formate. This procedure was performed for three biological replicates.

Peptide mixtures (0.2 μg/μl in 20 mM ammonium formate, pH 10) were separated on a NanoAcquity UPLC® system (Waters Corporation) in 2D mode. For the first dimension (high pH) the sample (1 μg) was loaded onto an Xbridge<sup>TM</sup> BEH130 C18 column (300 μm × 50 mm, 5 μm; Waters) at 3% solvent

B1 (A1 & B1: 20 mM ammonium formate in water and ACN respectively, pH 10) at 2  $\mu$ l/min. Peptides were eluted from the first dimension column in 5 fractions (11.1%, 14.5%, 17.4%, 20.8%, and 45.0% of solvent B1), and fractions were trapped on a Symmetry<sup>®</sup> C18 trapping column (180  $\mu$ m  $\times$  20 mm, 5  $\mu$ m; Waters). For the second dimension (low pH) each fraction was separated on a HSS T3 C18 analytical column (75  $\mu$ m  $\times$  250 mm, 1.8  $\mu$ m; Waters) at 40°C at 250 nl/min by increasing the acetonitrile concentration from 5 to 50% B2 (A2 & B2: 0.1% formic acid in water and ACN respectively, pH 2) over 60 min. The outlet of the column was directly connected to a PicoTip<sup>™</sup> Emitter (New Objective) mounted on a Nanolockspray source of a SYNAPT<sup>™</sup> G1 HDMS mass spectrometer (Waters). The time-of-flight (TOF) analyzer was externally calibrated with MS/MS fragments of human [glu1]-fibrinopeptide B (Glu-fib) from m/z 72 to 1285, and the data were corrected post-acquisition using the monoisotopic mass of the doubly charged precursor of Glu-fib (m/z 785.8426) (lock mass correction). Accurate mass data were collected in a data independent positive mode of acquisition (MS<sup>E</sup>) by alternating between low (5 V) and high (ranging from 15 to 35 V) energy scan functions (Geromanos et al., 2009). The selected m/z range was 125–2000 Da. The capillary voltage was set to 3.0 kV, the sampling cone voltage was 26 V and the extraction cone voltage 2.65 V. The source temperature was set at 65°C.

The acquired spectra (Waters.raw) were loaded to the Progenesis software (version 4.1, Nonlinear) for label free quantification. Peaks were then modeled in non-noisy areas to record their peak m/z value, intensity, area under the curve (AUC) and m/z width. After selecting a quality control sample (mixture of all samples) as a reference, the retention times of all other samples within the experiment are aligned to maximal overlay of the 2D feature maps. After alignment and feature exclusion, samples were divided into the appropriate condition. The identification was done by ProteinLynx Global SERVER v2.5 (PLGS, Waters Corporation). The precursor and fragment ion tolerance were determined automatically. The default protein identification criteria used included a maximal protein mass of 250,000 Da, a detection of minimal of three fragment ions per peptide, minimal seven fragment ions per protein and minimal two peptides per protein. Carbamidomethyl-cysteine (fixed) and methionine oxidation (variable) were selected as modifications. Maximally one missed cleavage and a false positive rate of 4% was allowed. After normalization of the raw abundances of all features and statistical analysis the different fractions were combined. For quantification, all unique peptides of an identified protein were included and the total cumulative abundance was calculated by summing the abundances of all peptides allocated to the respective protein. ANOVA values of  $p < 0.05$ , regulation of 1.5-fold or 0.66-fold, power  $> 0.8$  and q-values  $< 0.05$  were regarded as significant for all further results.

### Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring (LC-MRM) Analysis

The protein sample preparation and quantitation were similar to those for the LC-MS<sup>E</sup>. The protein lysate described above was mixed with 100 % (w/v) TCA solution (Sigma-Aldrich) (4:1). Protein solutions (50 µg) were spiked with 200 ng BSA (Protea Biosciences Group), reduced, alkylated and digested overnight with 0.5 µg trypsin (Promega). Digested samples were dried and dissolved in 500 µl 0.1% formic acid (Biosolve) in water for LC-MRM analysis (5 µl injection). This procedure was performed for three biological replicates.

The samples were subjected to RPLC on a U3000-RSLC system (Thermo). The samples were loaded onto a Thermo Acclaim® PepMap100 C18 pre-concentration column (2 cm x 100 µm, 5 µm, 100 Å) at a flow rate of 5 µl/min and flushed for 5 min with 0.1% HCOOH/2% ACN. The sample was then separated on a Thermo Acclaim® PepMap100 C18 analytical column (25 cm x 75 µm, 3 µm, 100 Å) at a flow rate of 300 nl/min during a 30 min linear gradient, going from 2 to 40% solvent B, with solvent A (0.1 % HCOOH in water) and solvent B (0.1% HCOOH in ACN). The eluting peptides were sprayed directly in a 4000 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex) with a NanoSpray II ESI source (AB Sciex) using a PicoTip™ Emitter (New Objective). The ion spray voltage, curtain gas and nebulizing gas were respectively set at 3.5 kV, 10 and 5 (arbitrary units). The interface heater temperature was fixed at 60°C.

Targeted peptides (two for each protein) were measured in multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode with a dwell time of 100 ms and maximum total cycle time of 3 s. The double charged peptide was selected as precursor (Q1), fragmented (Q2) and for each precursor three fragment ions (y-ions) were selected (Q3). The MRM data were imported in Skyline v3.1 and subjected to a Savitsky-Golay Smoothing transformation. The total area under the curve (AUC) of each targeted peptide was exported and normalized to the spiked BSA standard. A student's t-test (two-tailed, homoscedastic) was performed to evaluate the significance of the differential protein abundance levels between the different conditions.

### 8.6 Generation of the *cebR*, *cebE*, *msiK* and *bglC* genes deletions in *S. scabies* 87-22

Deletion mutants in *S. scabies* 87-22 were created using the REDIRECT® PCR targeting methodology (Gust et al. 2003) replacing the selected gene by an antibiotic deletion cassette. These cassettes consisting of an *oriT* and an antibiotic resistance gene (*aac(3)IV* for apramycin resistance), and flanked by FRT sites (FLP-recombinase recognition targets) were generated by PCR using primers with gene-specific homology extensions (Table 6), and pIJ773 (Table 5) as template. The gel-purified deletion cassettes were electroporated into the *E. coli* BW25113 strain harboring the arabinose-inducible λ RED expression plasmid, pIJ790, and cosmid 833 containing the gene of interest. Transformants were

recovered on apramycin selective medium, and correct gene replacement in the cosmid was confirmed by PCR and sequencing. The resulting mutated cosmid was then transferred into *S. scabies* 87-22 via intergeneric conjugation after passage through the *E. coli* ET12567 strain harboring pUZ8002 (Table 5). Exconjugants were selected for resistance to apramycin, and sensitivity to kanamycin. Genomic DNA was extracted from *Streptomyces* cultures grown in TSB medium using the MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) according to the manufacturer's instructions and verification of the mutant isolates was performed by PCR (data not shown).

## 8.7 Quantitative Real-Time PCR

RNA was prepared from 72-h old mycelia grown on ISP-4 and TDMc at 28°C using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCRs on the purified RNA were performed to verify the absence of genomic DNA (data not shown). cDNA synthesis was performed starting from 1 µg of DNase-treated (Turbo DNA-free Kit, Ambion) RNA using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad). Quantitative Real-Time PCR (qPCR) was carried out in a total volume of 10 µl containing 4 µl of SsoAdvanced™ Sybr® Green Supermix (BioRad), 4 µl of 1/10 diluted cDNA and 0.5 pmol of each gene-specific primer (Table 6), and subjected to the following PCR protocol: 3 min at 95°C, 40 cycles of 30 s at 95°C followed by 45 s at 60°C. A melting curve analysis (samples were heated from 60°C to 95°C) was performed after each qPCR run to verify the specific amplification of each product. The *murX* and *gyrA* genes (M. V. Joshi et al. 2007) were used to normalize for the amount of RNA in the samples. Each measurement was performed in triplicate with three biological replicates per strain or condition.

## 8.8 Thaxtomin extraction and quantification

Mycelial suspensions of *S. scabies* strains (wild-type and different isolates of each mutant) were prepared from 48-72 h-old TSB-grown cultures by pelleting the mycelia, washing twice with sterile water, and resuspending in sterile water to an A<sub>600</sub> of 1.0. Samples of 50 µl were plated out on small Petri dishes (5-cm diameter) containing 12.5 mL OBA or ISP-4 medium.

After incubation for 7 days at 28°C, the medium was chopped into small cubes and soaked in 8 mL of methanol for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.2-µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter and analyzed via HPLC on a Zorbax RX-C18 column (5 µm, 4.6 x 250 mm, Agilent Technologies) with a 1 mL/min flow rate of an isocratic mobile phase of 40:60 acetonitrile : water. Thaxtomin A was detected by measuring the absorbance at 380 nm. All experiments were repeated using different biological replicates of the *Streptomyces* strains, with three technical replicates per strain.

## 8.9 Virulence bioassays

### 8.9.1 With *ΔcebR* mutant

*Arabidopsis thaliana* (ecotype Col-0) seeds were surface sterilized with sodium hypochlorite and washed three times in deionized H<sub>2</sub>O. Seeds were suspended in 0.1% agarose and placed on Murashige-Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962) agar medium supplemented with 1% sucrose. After an incubation period of one night at 4°C, seeds were inoculated with the wild-type or *ΔcebR* spore suspension (10<sup>7</sup> spores/mL). Plants were grown at 21 ± 2°C, with a 12-h photoperiod, for 5 to 6 days. Potato tuber slices were prepared as described previously (Loria et al. 1995) and inoculated with 5 mg of *Streptomyces* mycelium. Potato slices were then incubated at 23 ± 2°C in a dark and moist incubator for 4 days.

### 8.9.2 With *ΔcebE* and *ΔmsiK* mutants

To assess the virulence phenotype of the *S. scabies* *ΔcebE* and *ΔmsiK* mutants, an *in vitro* radish seedling assay was performed. Seeds of the “White Beauty” variety (Burpee) were surface sterilized for 5 min in 70 % ethanol followed by a 10 min incubation in 15 % (vol/vol) bleach. The seeds were allowed to germinate for about 30 h at 21 ± 2°C in the dark in a Petri dish containing a moistened filter paper. Germinated radish seeds placed into six agar wells (13 mm in diameter) formed in an deep 1.5 % agar-water plate were inoculated each with a 200 µl mycelial sample, prepared as described above, or sterile water as the control. The plates were incubated at 21 ± 2°C under a 16-h photoperiod for 6 days. The assays were performed three times.

## 8.10 Fermentation assays

Preculture was prepared using 250 mL of liquid ISP2 medium seeded with at least 5.10<sup>8</sup> spores of *Streptomyces scabies* *ΔcebR* and incubated at 28°C for 24 to 48h under orbital agitation.

**Batch fermentation:** 15 L Rushton turbine agitator containing 12 L of ISP4 media was inoculated with 2 %v/v of ISP2 preculture. Culturs were incubated at 28°C for several days with a flow rate of sparged air fixed at 1 vvm and agitation rate of 250 rpm.

**Biofilm fermentation:** A 4 liters biofilm reactor containing ISP4 liquid medium was inoculated with 5 %v/v of ISP2 preculture. Condition with partially submerged solid support (approximately 10 % of the support was submerged) contained 1L of ISP4 medium while condition with almost completely submerged support (approximately 90 % of the support was submerged) contained 2 L of ISP4 medium. Culturs were incubated at 28°C for several days with a flow rate of sparged air fixed at 1 vvm. The recirculated medium was continually distributed at the top of the packing.

### Multiple Alignment of *S. griseus* CebR-binding sites

CebR target gene	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	score
SGR4739	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	A	15.24
SGR3391	C	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	G	12.56
SGR199	C	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	C	12.56
SGR217	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	G	14.04
SGR1971	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	C	14.04
SGR4738	A	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	C	A	13.95
SGR6928	T	G	G	G	A	G	C	G	C	T	C	C	A	A	14.44
<b>Consensus</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>15.24</b>

### Alignment Matrix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>A</b>	1	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	1	3
<b>C</b>	2	0	0	0	0	0	7	0	7	0	7	7	6	2
<b>G</b>	0	7	7	7	0	7	0	7	0	0	0	0	0	2
<b>T</b>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0

### CebR Position Weight Matrix

(Minimum score : -29.12; Maximum score : 15.24)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>A</b>	0.00	-2.08	-2.08	-2.08	1.84	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	0.00	1.01
<b>C</b>	-0.19	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	0.94	-2.08	0.94	-2.08	0.94	0.94	0.80	-0.19
<b>G</b>	-2.08	0.94	0.94	0.94	-2.08	0.94	-2.08	0.94	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-0.19
<b>T</b>	1.29	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08	1.84	-2.08	-2.08	-2.08	-2.08

**Figure 105: CebR position weight matrix (PWM).**

The PWM was constructed using the PREDetector software (Hiard et al. 2007) with CebR-binding sites experimentally validated in *Streptomyces griseus* (Marushima et al. 2009). Only different sequences were selected for the training set. The *a priori* (*pi*) was fixed at 71.5, as deduced from the GC content of the *S. scabies* 87-22 genome and using different types of threshold scores as suggested previously (Rigali et al. 2015).

## 8.11 Bioinformatics

### 8.11.1 Phylogeny and synteny

A search for orthologues of CebE from *S. reticuli* (GI:5327251) in selected *Streptomyces* species and synteny analysis were performed using the Archaeal and Bacterial Synten Explorer software (Absynthe) using the “best genomic match” search parameter at a 30 % minimal score threshold (<http://archaea.u-psud.fr/absynthe/>) (Despalins et al. 2011). Selected CebE homologues were used as a training set to generate the phylogenetic tree via the Phylogeny.fr platform (Dereeper et al. 2008) using the “One click” mode which provides a ready-to-use pipeline including the following programs: MUSCLE for multiple alignment, Gblocks for automatic alignment curation, PhyML for tree building, and TreeDyn for tree drawing. CebE homologues used for the analysis are listed in the legend of Figure 57.

### 8.11.2 Modeling

Modeling of the 3D structure of the CebE protein was performed with the YASARA software (Krieger & Vriend 2014) using as template the crystal structure of the ABC transporter Solute Binding Protein from *Thermotoga Lettingae* TMO (Tlet\_1705, TARGET EFI-510544) bound with alpha-D-Tagatose (5CI5). Because of the low sequence identity with the model (21.8%), the overall quality Z-score is only ranked as satisfactory (-1.929). The position of Trp303 in the binding pocket of CebE is clearly established as this residue is strictly conserved and well aligned in all structures used for molecular modelling. Modeling of the 3D structure of the BglC protein was performed online using PHYRE2 server (Kelley et al. 2015). The figures displaying these structures were obtained using the program Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4.3 Enhanced for Mac OS X, Schrödinger, LLC.).

### 8.11.3 Regulon prediction in streptomyces

The position weight matrix (PWM) was created and the CebR regulon in different species was computationally predicted with the PREDetector software (Hiard et al. 2007) as described previously (Craig et al. 2012). We used DNA motifs known to be bound by CebR in *S. griseus* (Marushima et al. 2009) as a training set to generate the PWM (PWM-CebR<sup>gr</sup>) (Figure 105) and scan the genomes of pathogenic *Streptomyces* species for similar DNA motifs using different types of threshold scores (Rigali et al. 2015). AfsQ1 and GlnR PWM were created using DNA motifs known to be bound in *S. coelicolor* by these regulators respectively (R. Wang et al. 2013; Tiffert et al. 2008a).

## 8.12 Tables

**Table 5: Strains and plasmids used in this thesis**

Strain or plasmid	Description†	Source or reference
<b><i>Streptomyces</i> strains</b>		
87-22 (wild type)	<i>S. scabies</i> wild type strain	(Loria et al. 1995)
$\Delta scab57761$ ( $\Delta cebR$ )	87-22 derivative with a deletion of the <i>scab57761</i> gene ( $Apr^R$ )	This thesis
$\Delta scab57751$ ( $\Delta cebE$ )	87-22 derivative with a deletion of the <i>scab57751</i> gene ( $Apr^R$ )	This thesis
$\Delta scab50161$ ( $\Delta msik$ )	87-22 derivative with a deletion of the <i>scab50161</i> gene ( $Apr^R$ )	This thesis
$\Delta scab57721$ ( $\Delta bgIC$ )	87-22 derivative with a deletion of the <i>scab57721</i> gene ( $Apr^R$ )	This thesis
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
BL21(DE3)	Host for heterologous expression of <i>cebR</i> from the pET-22b vector	New England Biolabs
DH5 $\alpha$	General cloning host	Gibco-BRL
BW25113	Host for the REDIRECT <sup>®</sup> PCR targeting system	(Gust et al. 2003)
ET12567	<i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS</i> <sup>-</sup> ; non-methylating host for transfer of DNA into <i>Streptomyces</i> spp. ( $Cml^R$ , $Tet^R$ )	(MacNeil et al. 2003)
<b>Plasmids or cosmids</b>		
pIJ790	$\lambda$ Red plasmid ( $t^S$ , $Cml^R$ )	(Gust et al. 2003)
pUZ8002	Supplies transfer functions for mobilization of <i>oriT</i> -containing vectors from <i>E. coli</i> to <i>Streptomyces</i> ( $Kan^R$ )	(Kieser et al. 2000)
pIJ773	Template for the REDIRECT <sup>®</sup> PCR targeting system, contains the [ <i>aac(3)IV+oriT</i> ] disruption cassette ( $Amp^R$ , $Apr^R$ )	(Gust et al. 2003)
SuperCos1	Cosmid cloning vector ( $Amp^R$ , $Kan^R$ )	Stratagene
Cosmid 833	SuperCos1 derivative containing the <i>S. scabies</i> 87-22 cellobiose utilization regulator <i>CebR</i> locus ( $Kan^R$ , $Amp^R$ )	This thesis
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Plasmid used for efficient cloning of PCR products ( $Amp^R$ )	Thermo scientific
pET28a	Expression vector used to produce N-terminal His-tagged protein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3). ( $Kan^R$ )	Novagen
pET-22b	Expression vector used for production of His <sub>6</sub> -tagged protein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3). ( $Amp^R$ )	Novagen
pSAJ001	pJET1.2 derivative containing the <i>S. scabies</i> 87-22 <i>cebR</i> gene ( $Amp^R$ )	This thesis
pSAJ002	pET22b derivative containing the <i>scab57761</i> ( <i>cebR</i> ) coding sequence inserted into <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites ( $Amp^R$ )	This thesis
pSAJ011	pJET1.2 derivative containing the <i>scab49561</i> ( <i>glnR</i> ) coding sequence ( $Amp^R$ )	This thesis



pSAJ012	pET28a derivative containing the <i>scab49561(glnR)</i> coding sequence inserted into <i>NdeI</i> and <i>BamHI</i> restriction sites (Kan <sup>R</sup> )	This thesis
pSAJ015	pJET1.2 derivative containing the <i>scab57751(cebE)</i> coding sequence without the first 132 nt (Amp <sup>R</sup> )	This thesis
pSAJ016	pET28a derivative containing the <i>scab57751(cebE)</i> coding sequence without the first 132 nt inserted into <i>NdeI</i> and <i>HindIII</i> restriction sites (Kan <sup>R</sup> )	This thesis
pSAJ021	pJET1.2 derivative containing the <i>scab57721(bglC)</i> coding sequence (Amp <sup>R</sup> )	This thesis
pSAJ022	pET28a derivative containing the <i>scab57721(bglC)</i> coding sequence inserted into <i>NdeI</i> and <i>HindIII</i> restriction sites (Kan <sup>R</sup> )	This thesis

† Cml<sup>R</sup>, chloramphenicol resistance; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance; Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance Apr<sup>R</sup>, apramycin resistance; Tet<sup>R</sup>, tetracyclin resistance; t<sup>s</sup>, temperature sensitive

**Table 6: Oligonucleotides used in this thesis**

Primer	Sequence (5'→ 3') *	Use
<b>Heterologous expression</b>		
<b><i>scab_57761</i> +3_ <i>NdeI</i> <i>scab_57761</i> +1056_ <i>EcoRI</i></b>	<i>CATATGGGTGACAGGCCACGGGGC</i> <i>GAATTCGGAAGAATCCCGCCCCACC</i>	PCR for cloning <i>scab57761</i> in pET22b
<b><i>scab_57751</i> + 132 <i>NdeI</i> <i>scab_57751</i> + 1365 <i>HindIII</i></b>	<i>CATATGGACGACGGCAAGGACGAGG</i> <i>AAGCTTTCACCTTGTCAGTGC GTTGTCTG</i>	PCR for cloning <i>scab57751</i> in pET28a
<b><i>scab_57721</i> +3_ <i>NdeI</i> <i>scab_57721</i> +1458_ <i>HindIII</i></b>	<i>TT CATATGCCTGAACCCGTGAATCCGG</i> <i>TTAAGCTTTGGTCCGTCGCTGCCCTACG</i>	PCR for cloning <i>scab57721</i> in pET28a
<b><i>scab_49561</i> +1_ <i>NdeI</i> <i>scab_49561</i> +815_ <i>HindIII</i></b>	<i>CATATGAGTTCTCTGTGCTGCC</i> <i>GGATCCGTTACCGGCGGTACGG</i>	PCR for cloning <i>scab49561</i> in pET28a
<b>Gene inactivation</b>		
<b>imf196 imf197</b>	<i>GATTCCACGCCAGCGCGGTAGTGACGGGAGACGACCAT</i> <u><i>GATTCCGGGGATCCGTCGACC</i></u>  <i>CAAGCGCTTCGTCATCCAGGTCGATCTGGGTGCGACTC</i> <u><i>ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i></u>	<i>scab57761</i> ( <i>cebR</i> ) Redirect deletion cassette
<b>imf274 imf275</b>	<i>AAATCTAGACCAGCGTGATCTTGGTCTTG</i> <i>AAATCTAGACCGTGTCCTTCTTCATGGTG</i>	PCR verification of <i>Δscab57761</i> ( <i>cebR</i> )
<b>sc052 sc053</b>	<i>CGGGGGGTCGGCACGTCAGGGCATCAGGAGGACGCAAT</i> <u><i>GATTCCGGGGATCCGTCGACC</i></u>  <i>GGGGCGCGGCGGTGCGGGCCTTGTGGGCATACCGGTCA</i> <u><i>TGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i></u>	<i>scab57751</i> ( <i>cebE</i> ) Redirect deletion cassette
<b>sc056 sc057</b>	<i>CTTACACATCCCGCACGTTCCC</i> <i>TGTCGGGCCTTGTGGGCATA</i>	PCR verification of <i>Δscab57751</i> ( <i>cebE</i> )

imf171	CGGCACGTTCTCTGCCGGTGAAGGGGGCCTACGACCCAT <u>GATTCGGGGATCCGTCGACC</u>	scab50161(msiK) Redirect deletion cassette
imf172	GGTTTCGCGCACGGTCACGGACGGGCCGTGCCCGGATC <u>ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	
imf177	TACCTGGAAC TCGCCTGGTC	PCR verification of Δscab50161 (msiK)
imf178	CATCCTGTTTGTCTGGGGTAG	
Imf298	CCGTCGGTCGACACGACCACCAATGGGAGCGCTTCCAT <u>GATTCGGGGATCCGTCGACC</u>	scab57721(bglC) Redirect deletion cassette
Imf299	GCTCCCCGGCCCCGGCTCCGTGGTCCGTCGCTGCCCT <u>ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	
Imf300	ATGCTGATGTTCTGTCAGAC	PCR verification of Δscab57721 (bglC)
Imf301	GAAGACGACGGTGAGGAAGC	
Gene expression analysis		
imf200	CTGGGTACGTCCCGAACAC	scab57761 (cebR)
imf201	CCTTGAGGATGTCTGGAGAAG	
imf190	CCTCGGGCAAGGTCATCTAC	scab57751 (cebE)
imf191	GCTGGAAC TCGCTCTGGTTC	
imf257	AAGATCCTCGACCTCACCGA	scab50161 (msiK)
imf258	GTCCATGAGGAACACCTGGG	
Imf302	GACCTTTCTCTCCGCCTTC	scab57721 (bglC)
Imf303	GTGTGACTGAAGGTGTCCCA	
imf341	TCCAGGTGATCCCGCTCTAC	scab57741 (cebF)
imf342	CGCATGAAGAACACACCGAA	
DRB9	TGGTCGAGGTCATCAACAAG	scab24441 (hrdB)
DRB10	TGGACCTCGATGACCTTCTC	
DRB13	GAGCGACTGTCCTTCATGG	scab31791 (txtA)
DRB14	CGTCGTCCAGTACCACGAG	
DRB21	GTCTGGCAGTTCAGGAGTC	scab67971 (murX)
DRB22	AGGTGTTCCACCACAGGAAG	
DRB23	GGACATCCAGACGAGTACA	scab45751 (gyrA)
DRB24	CTCGGTGTTGAGCTTCTCCT	
DRB48	CGGCTACTTCCCGATGGAT	scab31781 (txtB)
DRB49	CTCGATGTCACTCCTGGTCA	
EMSA		
SCAB_31791-909 Cy5 SCAB_31801-796	TGTCAATAAGCGGGAGCGCTCCCA CAGCGCTCTC GAGAGCGCTGTGGGAGCGCTCCCGCTTATTGACA	EMSA probe cbs <sup>txtR-A</sup>
SCAB_57751c-140 Cy5 SCAB_57761-506	CCAGGTACTGTGGGAGCGCTCCCA CAGAGTGATGT ACATCACTCGTGGGAGCGCTCCCA CAGTACCTGG	EMSA probe cbs <sup>cebR-E</sup>
SCAB_31781c + 1530 Cy5 SCAB_31781c + 1497	CTCCCCCAGGGGGAGCGCTCCCA CTGCGCTGTA TACAGCGCAGTGGGAGCGCTCCCCCTGGGGGAG	EMSA probe cbs <sup>txtB</sup>
SCAB_57721+10 SCAB_57721-24 Cy5	GGTTCAGGCATGGAAGCGCTCCCA TTGGTGGTCG CGACCACCAATGGGAGCGCTTCCATGCCTGAACC	EMSA probe cbs <sup>bglC</sup>

SCAB_90101-168 SCAB_90101-202 Cy5	GGACTCGTTC <b>TGGGAGCGCTCCCG</b> ATTTCGACGTC GACGTCGAAT <b>CGGGAGCGCTCCCA</b> GAACGAGTCC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>90101</sup>
SCAB_16431-240 SCAB_16431-274 Cy5	TCCCTATGAC <b>CGGAAGCGCTCCCA</b> GTTTTCGGCG CGCCGAAAAC <b>TGGGAGCGCTTCCG</b> GCATAGGGA	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>16431</sup>
SCAB_34801-29 SCAB_34801-63 Cy5	GAATCGACCG <b>TGGGAGCGCTCCCA</b> CCCGACACCC GGGTGTCGGG <b>TGGGAGCGCTCCAA</b> CGGTCGATTTC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>afsQ</sup>
SCAB_85841-10 SCAB_85841-44 Cy5	GTGGGCGCCG <b>CGGGAGCGCTCCCT</b> CCGACGCGGG CCCGCGTCGG <b>AGGGAGCGCTCCCG</b> CGGCGCCAC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>85841</sup>
SCAB_49071-203 SCAB_49071-237 Cy5	CCGGCCACCG <b>GGGGAGCGCTTCCA</b> TGGTGGTGCG CGCACCACCA <b>TGGAAGCGCTCCCC</b> CGGTGGCCGG	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>49071</sup>
SCAB_27461-310 SCAB_27461-344 Cy5	GCGAGACTGCT <b>TGGGAGCTCTCCG</b> CGCGGATTCA TGAATCCGCG <b>CGGGAGAGCTCCCA</b> GCAGTCTCGC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>27461</sup>
SCAB_23091-143 SCAB_23091-177 Cy5	GGCCGCGGG <b>AGGGAGCGCTCTCA</b> CCGGCGGGCC GGGCCGCCGG <b>TGAGAGCGCTCCCG</b> TCCCGCGGCC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>23091</sup>
SCAB_13521-81 SCAB_13521-47 Cy5	GCCGGTGATC <b>AGGGAGCGCTCTCA</b> ACGGCCTTGT ACAAGGCCGT <b>TGAGAGCGCTCCCT</b> GATCACCGGC	EMSA probe <i>cbs</i> <sup>13521</sup>
SCAB_66881-107 SCAB_66881-143 Cy5	TGACCCATTTGTTTCGCACAAGTTAACCGGACATCC GGATGTCCGGTTAACTTGTGCGAAACAAATGGGTCA	EMSA probe <i>gbs</i> <sup>glnA</sup>
SCAB_57751+191 SCAB_57751-227 Cy5	GATGTCTTCGGTTATCGGGCTGTTAACCTAACCCGGT ACCGGGTTAGTTAACAGCCCGATAACCGAAGACATC	EMSA probe <i>gbs</i> <sup>cebE</sup>

\* Engineered restriction sites are indicated in *italic*, CebR-binding sites are in **bold**, and non-homologous extensions are underlined.

## 9 Annexes

Table 7 : Prédiction du régulon CebR chez *S. scabies* (région intergénique)

Gene ID	Fonction	cis element	position	score	Co-transcribed gene ID	Co-transcribed gene fonction
SCAB_90101 SCAB_90091c	cellulase cellulase	tgggagcgctccca cgggagcgctccca	-761 -192 -106 -675	15.52 14.04	-	-
SCAB_90081c	cellulase B precursor	tgggagcgctccca	-61	15.52	-	-
SCAB_90061c	cellulase	tgggagcgctccca	-202	15.52	-	-
SCAB_89741c	cellulose-binding protein	tgggagcgctccca	-117	15.52	-	-
SCAB_78881	glycosylhydrolase	tgggagcgctccca	-85	15.52	-	-
SCAB_57761	cellobiose transport regulator	tgggagcgctccca	-496	15.52	-	-
SCAB_57751c	cellobiose-binding (transporter associated)		-131		-	-
SCAB_51081	cellulase	tgggagcgctccca	-54	15.52	-	-
SCAB_21081c	cellulose/chitin binding protein	tgggagcgctccca	-178	15.52	-	-
SCAB_17011 SCAB_17001c	cellulase cellulase	tgggagcgctccca tggaaccgctccca	-130 -283 -312 -159	15.52 9.22	- -	- -
SCAB_16431 SCAB_16421c	cellulase CelA1 LacI family transcriptional regulator	tgggagcgctccca tgggagcgcttccg tggaagcgcttcca	-113 -264 -128 -249 -98 -234	15.52 10.89 9.22	- -	- -
SCAB_8891 SCAB_8871c, cel1	Hypothetical protein endoglucanase	tgggagcgctccca	-851 -91	15.52	-	-
SCAB_5981, celB SCAB_5971c	cellulase B precursor hypothetical protein	tgggagcgctccca	-82 -557	15.52	- -	- -
SCAB_4971 SCAB_4961c	hypothetical protein hypothetical protein	tgggagcgctccca	-158 -67	15.52	- -	- -
		tgggagcgctccaa	-53	14.57		

SCAB_34801, afsQ1	two component system response regulator		-269		SCAB_34811	two component system sensor kinase
SCAB_34791c	sigma factor				-	-
SCAB_82041	pectate lyase	tgggagcgctcccg	-267	14.04	-	-
SCAB_82031c	endo-1,4-beta-xylanase		-92		-	-
SCAB_79011c	hypothetical protein	tgggagcgctcccg	-62	14.04	-	-
SCAB_31791c, txtA	thaxtomin synthetase A		-900	14.04	SCAB_31781c	thaxtomin synthetase B
SCAB_31801, txtR	cellobiose-dependent regulator TxtR	cgggagcgctccca	-786		-	-
SCAB_85841	DNA-binding protein	agggagcgctcccg	-34	12.53	SCAB_85851	AbaA-like protein
SCAB_85831c	hypothetical protein		-285		-	-
SCAB_57721c	beta-glucosidase	tggaagcgctccca	-14	12.37	-	-
SCAB_49071c	sporulation-associated protein	ggggagcgcttcca	-227	10.89	-	-
SCAB_49091	hypothetical protein		-501		-	-
SCAB_27451c	ATP/GTP-binding protein					
SCAB_27461, gcvT	glycine cleavage T protein aminomethyltransferase	cgggagagctccca	-140 -334	10.89	- -	- -
SCAB_23091	carbonic anhydrase	tgagagcgctcccg	-167	10.89	-	-
SCAB_13521c	transcriptional regulator	tgagagcgctccct	-71	10.86	-	-
SCAB_13531	hypothetical protein		-98		-	-
SCAB_39371	DNA-binding protein	cgggagcgccccca	-122	9.99	-	-
SCAB_57191	membrane-protein-insertion protein	ctggagggtccca	-17	9.94	-	-
SCAB_42461	hypothetical protein	ctggagccctccca	-13	9.94	SCAB_42471/SCAB_42481	hypothetical protein/hypothetical protein
SCAB_16581c	succinyl-coa synthetase subunit beta		-118	9.94	SCAB_16571c	succinyl-coa synthetase subunit alpha
SCAB_16591	TPP-requiring protein	cagagagcgctccaa	-40		SCAB_16601/SCAB_16611	transferase/hypothetical protein
SCAB_51701c	hypothetical protein	ttggagcggtccct	-121	9.91	-	-
SCAB_51711	hypothetical protein		-84		SCAB_51721	ATP/GTP-binding protein
SCAB_15711	glucosidase	acggagcgctcccc tgagagcgctctca	-111 -137	9.5 9.22	-	-
SCAB_25251c, gpsl	guanosine pentaphosphate synthetase/polyribonucleotide nucleotidyltransferase	agggagcggtcccc	-377	9.38	SCAB_25241c/SCAB_25231c/SCAB_25221c	M16 family endopeptidase/dihydrodipicolinate reductase/hypothetical protein
SCAB_19321c	regulatory protein	cgggaccgctccct	-44	9.38	-	-

Les gènes dont les *cbs* ont été validés par EMSAs sont situés au dessus de la ligne noire.

**Table 8 : Prédiction du régulon CebR chez *S. scabies* (regions intragénique)**

Gene ID	Function	<i>cis</i> element	Position	Score	Gene size
SCAB_72101	hypothetical protein	tgggagcgctcccc	418	14.04	834
SCAB_31781c, txtB	thaxtomin synthetase B	ggggagcgctccca	1507	14.04	4467
SCAB_82431c	hypothetical protein	tgggagcgcttcca	121	12.37	252
SCAB_59891	regulatory protein phosphatase	tgggatcgctccca	695	12.37	1176
SCAB_57721c	beta-glucosidase	tggaagcgctccca	-14	12.37	1443
SCAB_33591	hypothetical protein	tgggatcgctccca	1629	12.37	2010
SCAB_84861c	amidase	cgggagcgctcccc	264	12.34	2415
SCAB_57831c, adpA	A-factor-responsive transcriptional activator	ggggagcgctcccg	818	12.34	1224
SCAB_78171	hypothetical protein	ctggagcgctccaa	202	12.14	375
SCAB_78171	hypothetical protein	ctggagcgctccaa	202	11.92	375
SCAB_18481	hypothetical protein	tgggagcgaccca	403	11.47	669
SCAB_81171c, solA	sarcosine oxidase	tgggagcgctccaa	189	11.42	1146
SCAB_90571	oxidoreductase	gtggagcgctcccg	670	11.39	1131
SCAB_45471	hypothetical protein	cgggagcgctccag	98	11.39	843
SCAB_15631, emrR	MarR family transcriptional regulator	cgggagcgctccag	251	11.39	537
SCAB_11651c	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	cgggagcgctccac	657	11.39	870
SCAB_21571	transporter	acggagcgctccca	1037	10.98	1533
SCAB_67881c	hypothetical protein	ggtgagcgctccca	133	10.89	2526
SCAB_63031c	hypothetical protein	cgggaagcgctccca	458	10.89	1026
SCAB_54081	glycosyltransferase	ggggagcgctgccca	1257	10.89	2085
SCAB_48261c	hypothetical protein	cgggagcgctgccca	12	10.89	1356
SCAB_34281	regulatory protein	cgggaccgctccca	2281	10.89	3270
SCAB_3321	non-ribosomal peptide synthetase	cgggagcgcttcca	1336	10.89	16545
SCAB_1991c, acpD	ACP phosphodiesterase	tgtgagcgctcccc	60	10.89	651
SCAB_63031c	hypothetical protein	cgggaagcgctccca	458	10.67	1026
SCAB_48261c	hypothetical protein	cgggagcgctgccca	12	10.67	1356
SCAB_34281	regulatory protein	cgggaccgctccca	2281	10.67	3270
SCAB_3321	non-ribosomal peptide synthetase	cgggagcgcttcca	1336	10.67	16545
SCAB_50451	oxidoreductase	tgggagcgacccaa	565	10.52	1122
SCAB_24271c	M16 family peptidase	ttggtgcgctccca	237	10.52	1332
SCAB_75221, pyrAA	carbamoyl-phosphate synthase, pyrimidine-specific, small chain	ctggagcgctccac	760	10.44	1143

**Table 9 : Prédiction du régulon CebR chez *S. avermitilis* (région intergénique)**

Gene ID	Fonction	cis element	position	score	Co-transcribed gene ID	Co-transcribed gene fonction
<b>SAV_5257, cebR</b>	putative LacI-family transcriptional regulator					-
<b>SAV_5256c, cebE</b>	putative cellobiose ABC transporter solute-binding protein	tgggagcgctccca	-281 -132	15.59	SAV_5255c/SAV_5254c	putative cellobiose ABC transporter permease protein/putative cellobiose ABC transporter permease protein
<b>SAV_1855, guxA3</b>	putative secreted cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	tgggagcgctccca tgggaatcgctccca	-72 -215	15.59 9.25	-	-
<b>SAV_555, celA1</b>	putative secreted endo-1,4-beta-glucanase	tgggagcgctccca tgggagcgctccca tgggagcgctcccg	-72 -217 -48	15.59 15.59 14.14	-	-
<b>SAV_3352, smrA</b>	putative two-component system response regulator		-53		SAV_3353/SAV_3354	putative two-component system sensor kinase/putative lipoprotein
<b>SAV_3351c, sig25</b>	putative RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor	tgggagcgctccaa	-442	14.61	-	-
<b>SAV_7288, prpM4</b>	putative magnesium or manganese-dependent protein phosphatase		-119		SAV_7289	putative formamidopyrimidine-DNA glycosylase
<b>SAV_7287c</b>	putative integral membrane protein	cgggagcgctcccg	-207	12.48	-	-
<b>SAV_5253c, bglC2</b>	putative beta-glucosidase	tgggaagcgctccca	-86	12.42	-	-
<b>SAV_1695c</b>	putative LacI-family transcriptional regulator	tgagagcgctcccg	-71	10.97	-	-
<b>SAV_3543</b>	putative lipoprotein		-209		-	-
<b>SAV_3542c, savM1</b>	putative type II restriction-modification system DNA adenine-specific methylase	tgggagcgcgccaa	-508	10.59	-	-
<b>SAV_1874</b>	hypothetical protein		-286		-	-
<b>SAV_1873c, sig19</b>	putative RNA polymerase sigma factor	tgggagcgcacccg	-62	10.12	-	-
<b>SAV_1851c</b>	putative dehydrogenase	ttggagcgctctcg	-57	9.99	-	-

**Table 10 : Prédiction du régulon CebR chez *S. avermitilis* (regions intragénique)**

Gene ID	Function	<i>cis</i> element	Position	Score	Gene size
SAV_2254c, celS2	putative cellulose-binding protein	tgggagcgctccca	6	15.59	1176
SAV_5565, prpK	putative magnesium or manganese-dependent protein phosphatase	ggggagcgctccct	634	12.64	2220
SAV_5261c, adpA	putative AraC-family transcriptional regulator	ggggagcgctcccg	818	12.48	1281
SAV_1302, axe1	putative acetyl xylan esterase	cgggagcgctcccg	777	12.48	969
SAV_1799c, fusA3	putative translation elongation factor G	agggagcgctccac	291	11.66	2091
SAV_615c	hypothetical protein	gtggagcgctccct	214	11.66	678
SAV_140c	putative hydroxylase	tgggagcgcgccca	802	11.57	975
SAV_6018c	hypothetical protein	ttgaagcgctccca	501	11.44	522
SAV_2730c, serA	putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	ttggagcgcttcca	387	11.44	1590
SAV_2235c, ggaB	putative galactosamine-containing minor teichoic acid biosynthesis protein	tcggagcgctcccc	3318	11.1	4515
SAV_5980, aglA2	putative alpha-glucosidase	cgggagcgctacca	595	10.97	1851
SAV_5689c, asnH2	putative asparagine synthetase	cgggagccctccca	1593	10.97	1773
SAV_3711c	putative ATP-binding protein	ggcgagcgctccca	1111	10.97	1476
SAV_402c	hypothetical protein	tgggagcgctctcc	201	10.97	555
SAV_81c	putative oligosaccharide deacetylase, secreted	tgggagcggtcccc	681	10.97	771
SAV_1655c	putative ABC transporter ATP-binding protein	tggtagcgctccct	408	10.92	780
SAV_903	putative membrane protein	tgggagcgcttccct	37	10.92	1095
SAV_5980, aglA2	putative alpha-glucosidase	cgggagcgctacca	595	10.76	1851
SAV_5689c, asnH2	putative asparagine synthetase	cgggagccctccca	1593	10.76	1773
SAV_5261c, bdpA	putative AraC-family transcriptional regulator	ggggagcgctcccg	818	10.58	1281
SAV_5564c	putative two-component system sensor kinase	ttggagcgctgcaa	2748	10.46	4152
SAV_4336	hypothetical protein	cgggagcgcgccca	492	10.12	1350
SAV_3417c, trpS1	putative tryptophanyl-tRNA synthetase	tgggtgcgctcccg	870	10.12	1014
SAV_3031c, cyp14	cytochrome P450 hydroxylase	ttggagcgctccgg	1149	10.12	1371
SAV_1571	hypothetical protein	gtggagcgctccga	160	10.12	471
SAV_888c	putative hydrolase	tggggcgctcccc	1485	10.12	1521
SAV_773c	hypothetical protein	cggggcgctccca	195	10.12	738
SAV_7266	hypothetical protein	tgggagcgccacct	265	10.07	1833
SAV_6573c	putative glycosyltransferase	ttggagcgctcctt	738	10.07	819
SAV_7255	putative secreted protein	tgaagcgctccac	2252	9.99	2334



## 10 Références

- Aigle, B. & Corre, C., 2012. Waking up streptomyces secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods in Enzymology*, 517, pp.343–366.
- Alberts, B. et al., 2002. The Plant Cell Wall. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26928/> [Accessed March 24, 2016].
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F.M. & Díez, B., 2016. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology*, 9(2), pp.149–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833542> [Accessed March 24, 2016].
- Alvira, P. et al., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology*, 101(13), pp.4851–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042329> [Accessed July 11, 2014].
- Anon, 2015. *Lignocellulose-Based Bioproducts*, Springer. Available at: <https://books.google.com/books?id=33MoBgAAQBAJ&pgis=1> [Accessed May 2, 2016].
- Arias, a A., Craig, M. & Fickers, P., 2011. Gram-positive antibiotic biosynthetic clusters : a review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, pp.977–986.
- Atmodjo, M.A., Hao, Z. & Mohnen, D., 2013. Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 64, pp.747–79. Available at: [https://vpn.gw.ulg.ac.be/doi/full/10.1146/DanaInfo=www.annualreviews.org+annurev-arplant-042811-105534?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](https://vpn.gw.ulg.ac.be/doi/full/10.1146/DanaInfo=www.annualreviews.org+annurev-arplant-042811-105534?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&) [Accessed March 24, 2016].
- Babcock, M.J., Eckwall, E.C. & Schottel, J.L., 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *Journal of General Microbiology*, 139(7). Available at: [https://experts.umn.edu/en/publications/production-and-regulation-of-potatoscabinducing-phytotoxins-by-streptomyces-scabies\(004d2143-a9a4-4559-8fa4-5a9e7c9d4f2f\).html](https://experts.umn.edu/en/publications/production-and-regulation-of-potatoscabinducing-phytotoxins-by-streptomyces-scabies(004d2143-a9a4-4559-8fa4-5a9e7c9d4f2f).html) [Accessed March 10, 2016].
- Baffi, M.A. et al., 2013. Wine aroma improvement using a  $\beta$ -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(2), pp.493–501. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233193> [Accessed May 4, 2016].
- Bao, K. & Cohen, S.N., 2003. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes & development*, 17(6), pp.774–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651895> [Accessed June 9, 2016].
- Barka, E.A. et al., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(1), pp.1–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051> [Accessed May 12, 2016].
- Barry, S.M. et al., 2012. Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis. *Nature chemical biology*, 8(10), pp.814–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1048> [Accessed November 3, 2015].
- Bayer, E.A. et al., 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual review of microbiology*, 58, pp.521–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15487947> [Accessed March 15, 2016].
- Beauséjour, J. et al., 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(9), pp.764–768. Available at:

- <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w99-072?journalCode=cjm#.Vt2tpealeAU> [Accessed January 12, 2016].
- Belancic, A. et al., 2003. Beta-glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), pp.1453–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590497> [Accessed May 3, 2016].
- Bentley, S.D. et al., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), pp.141–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000953> [Accessed February 12, 2015].
- Bentley, S.D. & Parkhill, J., 2004. Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual review of genetics*, 38, pp.771–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15568993> [Accessed May 24, 2016].
- Bérdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), pp.1–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813176> [Accessed June 10, 2016].
- Berger, J., JAMPOLSKY, L.M. & GOLDBERG, M.W., 1949. Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties. *Archives of biochemistry*, 22(3), pp.476–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18134558> [Accessed January 31, 2016].
- Bernier, S.P. & Surette, M.G., 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in microbiology*, 4, p.20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23422936> [Accessed June 10, 2016].
- Bertram, R. et al., 2004. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology*, 186(5), pp.1362–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=344420&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bezerra, R.M.F. & Dias, A.A., 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(1), pp.49–59. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-005-0005-5> [Accessed May 3, 2016].
- Bibb, M.J., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), pp.208–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802254> [Accessed April 6, 2016].
- Bignell, D.R.D. et al., 2010. *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23(2), pp.161–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064060> [Accessed March 30, 2016].
- Bignell, D.R.D. et al., 2014. Thaxtomin A production and virulence are controlled by several bld gene global regulators in *Streptomyces scabies*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 27(8), pp.875–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678834>.
- Bignell, D.R.D. et al., 2010. What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), pp.179–194. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20396949> [Accessed January 12, 2016].
- Bignell, D.R.D., Fyans, J.K. & Cheng, Z., 2014. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *Journal of applied microbiology*, 116(2), pp.223–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131731> [Accessed January 12, 2016].
- Bischoff, V., Cookson, S.J., Wu, S. & Scheible, W.R., 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), pp.955–965.

- Bischoff, V., Cookson, S.J., Wu, S. & Scheible, W.-R., 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of experimental botany*, 60(3), pp.955–65. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/60/3/955.full> [Accessed May 2, 2016].
- Biver, S. et al., 2014. Two promising alkaline  $\beta$ -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(3), pp.479–88. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-014-1400-0/fulltext.html> [Accessed May 5, 2016].
- Bohlin, C. et al., 2013. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal  $\beta$ -glucosidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), pp.159–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311644> [Accessed May 4, 2016].
- Book, A.J. et al., 2016. Evolution of High Cellulolytic Activity in Symbiotic *Streptomyces* through Selection of Expanded Gene Content and Coordinated Gene Expression D. M. Hillis, ed. *PLOS Biology*, 14(6), p.e1002475. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002475> [Accessed June 22, 2016].
- Bouarab, K. et al., 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*, 418(6900), pp.889–892.
- Bouček-Mechiche, K. et al., 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted s. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50 Pt 1, pp.91–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826791> [Accessed January 15, 2016].
- Bown, L. et al., 2016. Production of the *Streptomyces scabies* coronafacoyl phytotoxins involves a novel biosynthetic pathway with an F420 -dependent oxidoreductase and a short-chain dehydrogenase/reductase. *Molecular microbiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991928> [Accessed June 8, 2016].
- Brochu, V. et al., 2010. Habituation to thaxtomin A in hybrid poplar cell suspensions provides enhanced and durable resistance to inhibitors of cellulose synthesis. *BMC plant biology*, 10(1), p.272. Available at: <http://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-10-272> [Accessed May 17, 2016].
- Bukhalid, R. a, Chung, S.Y. & Loria, R., 1998. nec1, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 11(10), pp.960–967. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1998.11.10.960>.
- Bukhalid, R.A. et al., 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, nec1, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the diastatochromogenes cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), pp.738–744.
- Bukhalid, R.A. & Loria, R., 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *Journal of bacteriology*, 179(24), pp.7776–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=179741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 13, 2016].
- Burrus, V. et al., 2002. Conjugative transposons: The tip of the iceberg. *Molecular Microbiology*, 46(3), pp.601–610.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, I.A., 2003. H ORMESIS : The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), pp.175–197. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>

[Accessed June 10, 2016].

- Cangelosi, G. a, Ankenbauer, R.G. & Nester, E.W., 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), pp.6708–6712.
- Cao, L.-C. et al., 2015. Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), p.202. Available at: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-015-0383-z> [Accessed May 3, 2016].
- Cao, Z. et al., 2012. Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic streptomycetes strain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(2), pp.353–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22313786>.
- Chapleau, M. et al., 2015. Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *Streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. *Molecular plant pathology*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12296/full> [Accessed January 11, 2016].
- Chater, K.F., 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of general microbiology*, 72(1), pp.9–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561048> [Accessed May 13, 2016].
- Chater, K.F. et al., 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), pp.171–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088961> [Accessed June 10, 2016].
- Chater, K.F. & Chandra, G., 2008. The use of the rare UUA codon to define ‘expression space’ for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in streptomycetes. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 46(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337685> [Accessed July 4, 2016].
- Chen, J. et al., 2016. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(1), pp.7–16.
- Cheng, Z. et al., 2015. Regulation of coronafacoyl phytotoxin production by the PAS-LuxR family regulator CfaR in the common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *PloS one*, 10(3), p.e0122450. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0122450> [Accessed January 21, 2016].
- Chi, W.J., Lee, S.Y. & Lee, J., 2011. Functional analysis of SGR4635-induced enhancement of pigmented antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Journal of Microbiology*, 49(5), pp.828–833.
- Clark, C.A., 1983. Susceptibility of Weed Species of Convolvulaceae to Root-Infecting Pathogens of Sweet Potato. *Plant Disease*, 67(8), p.907. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19840756114.html?freeview=true> [Accessed January 21, 2016].
- Colson, S. et al., 2008. The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 154(2), pp.373–382. Available at: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/011940-0> [Accessed July 13, 2016].
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, Wiley.
- Corrêa, T.L.R., Dos Santos, L.V. & Pereira, G.A.G., 2015. AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), pp.9–16. Available at:

- <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-7040-0/fulltext.html> [Accessed March 29, 2016].
- Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), pp.321–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35030000> [Accessed January 21, 2016].
- Craig, M. et al., 2012. Unsuspected control of siderophore production by N-acetylglucosamine in streptomycetes. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5), pp.512–521.
- Cunningham, G.C., 1912. The relationship of *Oospora scabies* to the higher bacteria. *Phytopathology*, 2, p.97.
- Dale, S.E. et al., 2003. Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Genes Involved in Production of a Siderophore. *Infection and Immunity*, 72(1), pp.29–37. Available at: <http://iai.asm.org/content/72/1/29.abstract> [Accessed May 31, 2016].
- Davies, G. & Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), pp.853–859. Available at: <http://www.cell.com/article/S0969212601002209/fulltext> [Accessed February 16, 2015].
- Davies, J., 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(7), pp.496–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552582> [Accessed June 10, 2016].
- Dayan, F.E. & Duke, S.O., 2014. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant physiology*, 166(3), pp.1090–105. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/166/3/1090.full> [Accessed May 2, 2016].
- Dees, M.W., Sletten, A. & Hermansen, A., 2013. Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology*, 62(1), pp.217–225. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.2012.02619.x> [Accessed January 14, 2016].
- Dees, M.W. & Wanner, L.A., 2012a. In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research*, 55(3-4), pp.249–268. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11540-012-9206-9> [Accessed January 12, 2016].
- Dees, M.W. & Wanner, L.A., 2012b. In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research*, 55(3-4), pp.249–268. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11540-012-9206-9/fulltext.html> [Accessed January 12, 2016].
- Dereeper, A. et al., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), pp.465–469.
- Despalins, A., Marsit, S. & Oberto, J., 2011. Absynthe: a web tool to analyze the evolution of orthologous archaeal and bacterial gene clusters. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(20), pp.2905–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840875>.
- Destain, J. et al., 2015. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. *Base*. Available at: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=12469> [Accessed April 25, 2016].
- Devos, S. et al., 2015. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology*, 6, p.298. Available at: [/pmc/articles/PMC4396451/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4396451/?report=abstract) [Accessed December 21, 2015].
- Doumbou, C.L., Akimov, V. & Beaulieu, C., 1998. Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), pp.4313–4316.

- Du, L. et al., 2000. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & biology*, 7(8), pp.623–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048953> [Accessed June 10, 2016].
- Duval, I. et al., 2005a. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta*, 222(5), pp.820–831.
- Duval, I. et al., 2005b. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta*, 222(5), pp.820–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025344> [Accessed May 17, 2016].
- Duval, I. & Beaudoin, N., 2009a. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Cell Reports*, 28(5), pp.811–830.
- Duval, I. & Beaudoin, N., 2009b. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant cell reports*, 28(5), pp.811–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198845> [Accessed May 17, 2016].
- Elesawy, A.A. & Szabo, M., 1979. Isolation and characterization of *Streptomyces scabies* strains from scab lesions of potato tubers. Designation of the neotype strain of *Streptomyces scabies*. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 26(4), pp.311–320. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19811600193.html;jsessionid=39D5788927DC50A2821C2E35A7441F20?freeview=true> [Accessed January 6, 2016].
- Errakhi, R. et al., 2008. An early Ca<sup>2+</sup> influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of experimental botany*, 59(15), pp.4259–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015217> [Accessed May 17, 2016].
- Fang, Z. et al., 2010. Cloning and characterization of a beta-glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(9), pp.1351–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890102> [Accessed April 28, 2016].
- Faucher, E. et al., 1993. Characterization of streptomycetes causing russet scab in Quebec. *Plant Disease (USA)*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9431730> [Accessed March 11, 2016].
- Fellows, H., 1926. RELATION OF GROWTH IN THE POTATO TUBER TO THE POTATO-SCAB DISEASE. *Journal of Agricultural Research*, XXXII(8), pp.757–781.
- Firn, R.D. & Jones, C.G., 2000. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular microbiology*, 37(5), pp.989–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972818> [Accessed June 10, 2016].
- Fontes, C.M.G.A. & Gilbert, H.J., 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual review of biochemistry*, 79, pp.655–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373916> [Accessed November 23, 2015].
- Forsberg, Z. et al., 2011. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 20(9), pp.1479–83. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190143&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190143&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed March 29, 2016].
- Francis, I.M. et al., 2015. The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *mBio*, 6(2), p.e02018. Available at: <http://mbio.asm.org/content/6/2/e02018-14.full>.

- Frandsen, K.E.H. et al., 2016. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 12(4), pp.298–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928935> [Accessed March 1, 2016].
- Fry, B. a. & Loria, R., 2002. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(1), pp.1–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576501903716>.
- Fyans, J.K. et al., 2014. Characterization of the Coronatine-Like Phytotoxins Produced by the Common Scab Pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 28(4), pp.443–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423263> [Accessed March 30, 2016].
- Gallegos, M.T. et al., 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(4), pp.393–410.
- Georgelis, N., Nikolaidis, N. & Cosgrove, D.J., 2014. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydrate polymers*, 100, pp.17–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188833> [Accessed March 31, 2016].
- Gerber, N.N. & Lechevalier, H.A., 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied microbiology*, 13(6), pp.935–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5866039> [Accessed June 9, 2016].
- de Giuseppe, P.O. et al., 2014. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 70(Pt 6), pp.1631–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914974> [Accessed April 26, 2016].
- Goethals, K. et al., 2001. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual Review of Phytopathology*, 39, pp.27–52. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11701858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11701858).
- Goyer, C. & Beaulieu, C., 1997. Host Range of Streptomyces Strains Causing Common Scab. *Plant Disease*, 81(8), pp.901–904. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.1997.81.8.901> [Accessed March 30, 2016].
- Goyer, C., Vachon, J. & Beaulieu, C., 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* Mutants Altered in Thaxtomin A Production. *Phytopathology*, 88(5), pp.442–445.
- Graça, J. & Santos, S., 2007. Suberin: a biopolyester of plants' skin. *Macromolecular bioscience*, 7(2), pp.128–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295399> [Accessed March 7, 2016].
- Gruno, M. et al., 2004. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and bioengineering*, 86(5), pp.503–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129433> [Accessed May 2, 2016].
- Guan, D. et al., 2012. Evidence That Thaxtomin C Is a Pathogenicity Determinant of *Streptomyces ipomoeae*, the Causative Agent of *Streptomyces* Soil Rot Disease of Sweet Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(3), pp.393–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22088193> [Accessed January 12, 2016].
- Guo, B., Amano, Y. & Nozaki, K., 2016. Improvements in Glucose Sensitivity and Stability of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -Glucosidase Using Site-Directed Mutagenesis. *PloS one*, 11(1), p.e0147301. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147301> [Accessed May 3, 2016].
- Güssow, H.T., 1914. THE SYSTEMATIC POSITION OF THE ORGANISM OF THE COMMON POTATO SCAB. *Science (New York, N.Y.)*, 39(1003), pp.431–3. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17781835> [Accessed January 6, 2016].
- Guyton, K.Z. et al., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet. Oncology*, 16(5), pp.490–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801782> [Accessed March 25, 2015].
- Hackl, S. & Bechthold, A., 2015. The Gene bldA, a regulator of morphological differentiation and antibiotic production in streptomyces. *Archiv der Pharmazie*, 348(7), pp.455–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917027> [Accessed May 26, 2016].
- Hantke, K., 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(2), pp.172–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282473> [Accessed May 31, 2016].
- Harholt, J., Suttangkakul, A. & Vibe Scheller, H., 2010. Biosynthesis of Pectin. *PLANT PHYSIOLOGY*, 153(2), pp.384–395. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.156588> [Accessed July 18, 2016].
- He, F. et al., 2009. Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 191(18), pp.5802–5813.
- Healy, F.G. et al., 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *Journal of bacteriology*, 184(7), pp.2019–29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 12, 2016].
- Healy, F.G. et al., 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 38(4), pp.794–804.
- Healy, F.G., Bukhalid, R.A. & Loria, R., 1999. Characterization of an insertion sequence element associated with genetically diverse plant pathogenic *Streptomyces* spp. *Journal of bacteriology*, 181(5), pp.1562–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 7, 2016].
- Healy, F.G. & Lambert, D.H., 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(15), pp.479–482. Available at: <http://ijs.sgmjournals.org/content/41/4/479.short>.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*, 280 ( Pt 2, pp.309–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1130547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 25, 2016].
- Hiard, S. et al., 2007. PREDetector: A new tool to identify regulatory elements in bacterial genomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(4), pp.861–864.
- Hill, J. & Lazarovits, G., 2005. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(1), pp.46–52. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060660509507192> [Accessed January 6, 2016].
- Hiltunen, L.H. et al., 2005. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. *Annals of Applied Biology*, 146(3), pp.395–403. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7348.2005.040083.x> [Accessed February 1, 2016].
- Himmel, M.E. et al., 1986. Isolation and characterization of a 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase from the yeast, *Torulopsis wickerhamii*. *The Journal of biological chemistry*, 261(28), pp.12948–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3093475> [Accessed May 6, 2016].



- Hodgson, D.A., 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in microbial physiology*, 42, pp.47–238.
- Hogenhout, S.A. & Loria, R., 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology*, 11(4), pp.449–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639483> [Accessed March 2, 2016].
- Hooker, W.J., 1949. Parasitic action of *Streptomyces scabies* on roots seedlings. *Phytopathology*, 39, pp.442–462.
- Hu, X. et al., 2013. *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), pp.678–83. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3545744&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3545744&tool=pmcentrez&render_type=abstract).
- Huguet-Tapia, J.C. et al., 2011. *Streptomyces turgidiscabies* Car8 contains a modular pathogenicity island that shares virulence genes with other actinobacterial plant pathogens. *Plasmid*, 65(2), pp.118–124.
- Huguet-Tapia, J.C., Bignell, D.R.D. & Loria, R., 2014. Characterization of the integration and modular excision of the integrative conjugative element PAISt in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PloS one*, 9(6), p.e99345. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4057263&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4057263&tool=pmcentrez&render_type=abstract).
- Hurtubise, Y. et al., 1995. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Molecular microbiology*, 17(2), pp.367–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494485>.
- Inman, S. & Shawn, S., 2013. Methods of controlling weeds with thaxtomin and thaxtomin compositions in combination with a beneficial herbicide. Available at: <http://www.google.com/patents/WO2013066894A2?cl=en> [Accessed May 2, 2016].
- Jalak, J. et al., 2012. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *The Journal of biological chemistry*, 287(34), pp.28802–15. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3436550&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3436550&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed May 4, 2016].
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp.1719–1728. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006> [Accessed June 9, 2016].
- Jeng, W.-Y. et al., 2011. Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of structural biology*, 173(1), pp.46–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682343> [Accessed February 28, 2016].
- Johnson, E., 2016. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(2), pp.164–174. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/bbb.1634> [Accessed May 2, 2016].
- Johnson, E.G. et al., 2009. 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase TxtB in the thaxtomin A biosynthetic pathway. *Molecular Microbiology*, 73(3), pp.409–418.
- Johnson, E.G. et al., 2007. Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), pp.18–25.

- Jones, A.P., 1931. The Histogeny of Potato Scab. *Annals of Applied Biology*, 18(3), pp.313–333. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7348.1931.tb02306.x> [Accessed January 12, 2016].
- Joshi, M. et al., 2007. Streptomyces turgidiscabies secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(6), pp.599–608. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555268> [Accessed January 13, 2016].
- Joshi, M. V & Loria, R., 2007. Streptomyces turgidiscabies possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(7), pp.751–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601163> [Accessed June 8, 2016].
- Joshi, M. V. et al., 2007. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in Streptomyces scabies. *Molecular Microbiology*, 66(3), pp.633–642.
- Jourdan, S. et al., 2016. The CebE/MsiK Transporter is a Doorway to the Cello-oligosaccharide-mediated Induction of Streptomyces scabies Pathogenicity. *Scientific Reports*, 6, p.27144.
- Kang, Y. et al., 2011. Methods of controlling algae with thaxtomin and thaxtomin compositions. Available at: <https://www.google.be/patents/US7989393?dq=Methods+of+controlling+algae+with+thaxtomin+and+thaxtomin+compositions&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjEnc3hpLvMAhXCPxoKHxwBDakQ6AEISTAF> [Accessed May 2, 2016].
- Kannenbergh, E.L. & Poralla, K., 1999. Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. *Naturwissenschaften*, 86(4), pp.168–176. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s001140050592> [Accessed January 13, 2016].
- Kelley, L.A. et al., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), pp.845–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053> [Accessed May 8, 2015].
- Kemner, J.M., Liang, X. & Nester, E.W., 1997. The Agrobacterium tumefaciens virulence gene chvE is part of a putative ABC-type sugar transport operon. *Journal of bacteriology*, 179(7), pp.2452–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=178989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kengen, S.W. et al., 1993. Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. *European journal of biochemistry / FEBS*, 213(1), pp.305–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8477701> [Accessed May 3, 2016].
- Kerff, F. et al., 2008. Crystal structure and activity of Bacillus subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), pp.16876–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2579346&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed March 31, 2016].
- Kers, J.A. et al., 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on Streptomyces species. *Molecular Microbiology*, 55(4), pp.1025–1033.
- Kers, J.A. et al., 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature*, 429(6987), pp.79–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129284> [Accessed January 12, 2016].
- Keukens, E.A. et al., 1996. Glycoalkaloids selectively permeabilize cholesterol containing biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1279, pp.243–250. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603093>.

- Kieser, T. et al., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*,
- Kinashi, H., Someno, K. & Sakaguchi, K., 1984. Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. *The Journal of antibiotics*, 37(11), pp.1333–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6511660> [Accessed February 24, 2016].
- King, R.R. et al., 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (13), p.849. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1989/c3/c39890000849> [Accessed January 12, 2016].
- King, R.R. & Calhoun, L.A., 2009. The thaxtomin phytotoxins: Sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), pp.833–841.
- King, R.R. & Calhoun, L.A., 2009. The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 70(7), pp.833–41. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942209001678> [Accessed May 17, 2016].
- King, R.R., Lawrence, C.H. & Clark, M.C., 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal*, 68(10), pp.675–680. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF02853743> [Accessed March 30, 2016].
- King, R.R., Lawrence, C.H. & Gray, J.A., 2001. Herbicidal properties of the thaxtomin group of phytotoxins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), pp.2298–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368592> [Accessed May 25, 2016].
- Kinkel, L.L. et al., 1998. Quantitative relationships among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology*, 44(8), pp.768–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830106> [Accessed March 30, 2016].
- Klein-Marcuschamer, D. et al., 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), pp.1083–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095526> [Accessed March 7, 2016].
- Kodani, S. et al., 2013. Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plant pathogen *Streptomyces scabies* 87.22. *Organic & biomolecular chemistry*, 11(28), pp.4686–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752895> [Accessed May 31, 2016].
- Koivunen, M., Marrone, P. & Boddy, L., 2015. Uses of thaxtomin and thaxtomin compositions as herbicides. Available at: <http://www.google.ch/patents/US9066516?hl=fr> [Accessed May 2, 2016].
- Komeil, D. et al., 2014a. Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. *Proteome science*, 12(1), p.35. Available at: <http://proteomesci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-5956-12-35> [Accessed March 7, 2016].
- Komeil, D. et al., 2014b. Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. *Proteome science*, 12, p.35. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4098958&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4098958&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed December 22, 2015].
- Kos, V. & Ford, R.C., 2009. The ATP-binding cassette family: A structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(19), pp.3111–3126.
- Krieger, E. & Vriend, G., 2014. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(20), pp.2981–2. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4184264&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed December 22, 2015].
- Kritzman, G. et al., 1996. Pod wart disease of peanuts. *Phytoparasitica*, 24(4), pp.293–304. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF02981412> [Accessed January 15, 2016].
- Labeda, D.P. et al., 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(1), pp.73–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045019> [Accessed March 2, 2016].
- Lambert, D.H. et al., 2007. Recommendation for the conservation of the name *Streptomyces scabies*. Request for an Opinion. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 57(10), pp.2447–2448. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijls.0.65275-0#R13> [Accessed January 6, 2016].
- Lambert, D.H. & Loria, R., 1989a. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), pp.393–396.
- Lambert, D.H. & Loria, R., 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), pp.393–396. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-39-4-393> [Accessed February 19, 2016].
- Lambert, D.H. & Loria, R., 1989. *Streptomyces scabies*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), pp.387–392.
- Lambert, S. et al., 2014. Altered desferrioxamine-mediated iron utilization is a common trait of bald mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(8), pp.1390–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788337>.
- Lamont, I.L. et al., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), pp.7072–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 31, 2016].
- Lauzier, A. et al., 2002. Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. *Canadian journal of microbiology*, 48(4), pp.359–364.
- Lauzier, A. et al., 2008. Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. *Molecular Plant Pathology*, 9(6), pp.753–762.
- Lawlor, E.J., Baylis, H. a. & Chater, K.F., 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes & development*, 1(10), pp.1305–1310.
- Lawlor, M.S., O’connor, C. & Miller, V.L., 2007. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and immunity*, 75(3), pp.1463–72. Available at: <http://iai.asm.org/content/75/3/1463> [Accessed May 31, 2016].
- Lawrence, C.H. & Barker, W.G., 1963. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* on Potato Tubers cultured in vitro. *Nature*, 199(4892), pp.509–510. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/199509a0> [Accessed January 12, 2016].
- Lazarovits, G. et al., 2004. Biotransformation of the *Streptomyces scabies* phytotoxin thaxtomin A by the fungus *Aspergillus niger*. *Canadian journal of microbiology*, 50(2), pp.121–126.
- Lebo, S.E. et al., 2001. Lignin. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471238961.12090714120914.a01.pub2> [Accessed June 10,

2016].

- Lee, H.-L. et al., 2012. Mutations in the substrate entrance region of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 25(11), pp.733–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077275> [Accessed May 6, 2016].
- Leep, D. et al., 2010. Use of Thaxtomin for Selective Control of Rice and Aquatic Based Weeds. Available at: <https://www.google.com/patents/US20100267560> [Accessed May 2, 2016].
- Legault, G.S. et al., 2011. Tryptophan Regulates Thaxtomin A and Indole-3-Acetic Acid Production in *Streptomyces scabiei* and Modifies Its Interactions with Radish Seedlings. *Phytopathology*, 101(9), pp.1045–1051.
- Leiner, R. et al., 1996. Probable Involvement of Thaxtomin A in Pathogenicity of *Streptomyces scabies* on Seedlings. *Phytopathology*, 86(7), pp.709–713.
- Lerat, S. et al., 2010. Involvement of the plant polymer Suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *streptomyces scabies*. *Phytopathology*, 100(1), pp.91–96.
- Lerat, S. et al., 2012. Potato Suberin Induces Differentiation and Secondary Metabolism in the Genus *Streptomyces*. *Microbes and Environments*, 27(1), pp.36–42.
- Lerat, S., Babana, A.H., et al., 2009. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 28(12), pp.1895–1903.
- Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.M. & Beaulieu, C., 2009. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 10(5), pp.579–585.
- Li, G. et al., 2012. Molecular cloning and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. *Bioresource technology*, 123, pp.15–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940294> [Accessed April 20, 2016].
- Liao, C.-H. et al., 2015. Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), pp.15630–5. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/51/15630.full?sid=d1b75dc0-1267-46e8-b3be-909f56ad3b8e> [Accessed March 4, 2016].
- Liu, X., Ma, Y. & Zhang, M., 2015. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. *Biotechnology letters*, 37(8), pp.1541–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957563> [Accessed May 12, 2016].
- Lombard, V. et al., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp.D490–5. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3965031&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3965031&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed October 20, 2015].
- Loria, R. et al., 2003. A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), pp.65–72.
- Loria, R. et al., 1995. Differential Production of Thaxtomins by Pathogenic *Streptomyces* Species in Vitro. *Phytopathology*, 85(5), pp.537–541.
- Loria, R. et al., 1997. PLANT PATHOGENICITY IN THE GENUS *STREPTOMYCES*. *Plant Disease*, 81(8), pp.836–846. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19981001502.html;jsessionid=D11E0EB390159A20D1E1B353177BECB7?freeview=true> [Accessed December 16, 2015].
- Loria, R. et al., 2008. Thaxtomin biosynthesis: The path to plant pathogenicity in the genus

- Streptomyces. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 94(1), pp.3–10.
- Loria, R., Kers, J. & Joshi, M., 2006. Evolution of plant pathogenicity in Streptomyces. *Annual review of phytopathology*, 44, pp.469–487.
- Lu, J. et al., 2013. Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from a soil metagenome. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45(8), pp.664–73. Available at: <http://abbs.oxfordjournals.org/content/45/8/664.full> [Accessed May 6, 2016].
- Luo, M., Fadeev, E.A. & Groves, J.T., 2005. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nature chemical biology*, 1(3), pp.149–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408019> [Accessed May 31, 2016].
- Luo, S. et al., 2014. An extracytoplasmic function sigma factor,  $\sigma(25)$ , differentially regulates avermectin and oligomycin biosynthesis in Streptomyces avermitilis. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(16), pp.7097–112. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811406> [Accessed June 25, 2016].
- Lynd, L.R. et al., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 66(3), pp.506–77, table of contents. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 24, 2016].
- Maicas, S. & Mateo, J.J., 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(3), pp.322–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635463> [Accessed April 4, 2016].
- Mansfield, J. et al., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), pp.614–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672649> [Accessed December 18, 2015].
- Manteca, A. et al., 2011. Phosphoproteome analysis of Streptomyces development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *Journal of proteome research*, 10(12), pp.5481–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21999169> [Accessed May 18, 2016].
- Martin, J.F. & Liras, P., 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in Streptomyces. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), pp.263–273.
- Marushima, K., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S., 2009. CebR as a master regulator for cellulose/celooligosaccharide catabolism affects morphological development in Streptomyces griseus. *Journal of Bacteriology*, 191(19), pp.5930–5940.
- Matsuzawa, T. et al., 2016. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity and transglycosylation activity of metagenomic  $\beta$ -glucosidase Td2F2. *The FEBS journal*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27092463> [Accessed May 5, 2016].
- Mattson, M.P. & Calabrese, E.J., 2009. *Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*, Springer Science & Business Media.
- Maurya, D.P., Singla, A. & Negi, S., 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5), pp.597–609. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-015-0279-4> [Accessed May 2, 2016].
- Mba Medie, F. et al., 2012. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature reviews. Microbiology*, 10(3), pp.227–34. Available at: <https://vpn.gw.ulg.ac.be/nrmicro/journal/v10/n3/full/,DanaInfo=www.nature.com+nrmicro2729.html> [Accessed March 29, 2016].

- McCormick, J.R. & Flärdh, K., 2012. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS microbiology reviews*, 36(1), pp.206–31. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3285474&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3285474&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed May 4, 2016].
- McDonald, A.G. & Tipton, K.F., 2014. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal*, 281(2), pp.583–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103004> [Accessed March 25, 2016].
- McQueen-Mason, S.J. & Cosgrove, D.J., 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant physiology*, 107(1), pp.87–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536663> [Accessed June 8, 2016].
- Meimoun, P. et al., 2009. Two different signaling pathways for thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis* and tobacco BY2. *Plant signaling & behavior*, 4(2), pp.142–4. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637503&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637503&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed May 17, 2016].
- Meleiro, L.P. et al., 2015. A *Neurospora crassa*  $\beta$ -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong glucose tolerance and stimulation by glucose and xylose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, pp.131–140. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117715300643> [Accessed May 3, 2016].
- Méndez, C. et al., 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian journal of microbiology*, 31(5), pp.446–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3891055> [Accessed May 12, 2016].
- Merrick, M.J., 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of general microbiology*, 96(2), pp.299–315. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/186556> [Accessed May 26, 2016].
- Miguélez, E.M., Hardisson, C. & Manzanal, M.B., 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145(3), pp.515–25. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2185084&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2185084&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed May 26, 2016].
- Millard, W.A., 1923. COMMON SCAB OF POTATOES. *Annals of Applied Biology*, 10(1), pp.70–88. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7348.1923.tb05654.x> [Accessed January 6, 2016].
- Miyajima, K. et al., 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 2, pp.495–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731290> [Accessed June 1, 2016].
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> [Accessed July 13, 2016].
- Murphy, L. et al., 2013. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. *Enzyme and microbial technology*, 52(3), pp.163–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410927> [Accessed May 2, 2016].
- Nascimento, C.V. et al., 2010. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated beta-D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 48(1), pp.53–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20221730> [Accessed May 6, 2016].
- Natsume, M. et al., 2005. Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(5), pp.364–369. Available at:

- <http://link.springer.com/10.1007/s10327-005-0211-6> [Accessed January 15, 2016].
- Natsume, M., RYU, R. & ABE, H., 1996. Production of Phytotoxins, Concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab. *Japanese Journal of Phytopathology*, 62(4), pp.411–413. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19971002126.html;jsessionid=B108C24A1728DFBE53598D830E4C483A> [Accessed February 24, 2016].
- Nikolaidis, N., Doran, N. & Cosgrove, D.J., 2014. Plant expansins in bacteria and fungi: evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Molecular biology and evolution*, 31(2), pp.376–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150040> [Accessed March 31, 2016].
- Nothaft, H. et al., 2003. In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 185(3), pp.929–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=142823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2016].
- Nothaft, H. et al., 2010. The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Molecular microbiology*, 75(5), pp.1133–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20487300> [Accessed July 19, 2016].
- Padilla-Reynaud, R. et al., 2015. Suberin Regulates the Production of Cellulolytic Enzymes in *Streptomyces scabiei*, the Causal Agent of Potato Common Scab. *Microbes and environments / JSME*, 30(3), pp.245–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4567563&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed December 22, 2015].
- Park, A.-R. et al., 2012. Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel. *Mycobiology*, 40(3), pp.173–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3483394&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed May 4, 2016].
- Pei, J. et al., 2012. Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum  $\beta$ -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), p.31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3395577&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed May 3, 2016].
- Pérez-Pons, J.A., Rebordosa, X. & Querol, E., 1995. Properties of a novel glucose-enhanced beta-glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochimica et biophysica acta*, 1251(2), pp.145–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7669803> [Accessed May 5, 2016].
- Petrus, M.L.C. & Claessen, D., 2014. Pivotal roles for *Streptomyces* cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), pp.127–39. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10482-014-0157-9/fulltext.html> [Accessed January 13, 2016].
- Podgornaia, A.I. & Laub, M.T., 2013. Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), pp.156–162.
- Podkaminer, K.K. et al., 2011. Enzyme inactivation by ethanol and development of a kinetic model for thermophilic simultaneous saccharification and fermentation at 50 °C with *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2. *Biotechnology and bioengineering*, 108(6), pp.1268–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192004> [Accessed May 3, 2016].



2016].

- te Poele, E.M., Bolhuis, H. & Dijkhuizen, L., 2008. Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 94(1), pp.127–143.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. & Jacobson, G.R., 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews*, 57(3), pp.543–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2016].
- Pullan, S.T. et al., 2011. Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC Genomics*, 12(1), p.175. Available at: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-175> [Accessed June 29, 2016].
- Qing, Q., Yang, B. & Wyman, C.E., 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource technology*, 101(24), pp.9624–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708404> [Accessed May 2, 2016].
- Quadri, L.E. et al., 1999. Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, 38(45), pp.14941–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555976> [Accessed May 31, 2016].
- Quadri, L.E. et al., 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chemistry & biology*, 5(11), pp.631–645.
- Quintana, E.T. et al., 2008. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(3), pp.305–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157699> [Accessed June 20, 2016].
- Rajasree, K.P. et al., 2013. Highly glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(9), pp.967–75. Available at: <https://vpn.gw.ulg.ac.be/article/10.1007/s10295-013-1291-5/DanaInfo=link.springer.com+fulltext.html> [Accessed May 3, 2016].
- Ramani, G. et al., 2015. Molecular cloning and expression of thermostable glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and its characterization. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(4), pp.553–65. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-014-1549-6/fulltext.html> [Accessed May 6, 2016].
- Rigali, S. et al., 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), pp.670–675. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/embor.2008.83/full>.
- Rigali, S. et al., 2006. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology*, 61(5), pp.1237–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16925557> [Accessed June 1, 2016].
- Rigali, S., Nivelle, R. & Tocquin, P., 2015. On the necessity and biological significance of threshold-free regulon prediction outputs. *Mol. BioSyst.*, 11, pp.333–337. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4MB00485J>.
- Riou, C. et al., 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), pp.3607–14. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2016].
- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I. & Sánchez, S., 2015. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(8), pp.1017–39. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939915001303> [Accessed January 17, 2016].
- Rosche, B. et al., 2009. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends in biotechnology*, 27(11), pp.636–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783314> [Accessed April 25, 2016].
- Ruiz, B. et al., 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408410903489576> [Accessed January 22, 2016].
- Sacristán, S. & García-Arenal, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular plant pathology*, 9(3), pp.369–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18705877> [Accessed March 22, 2016].
- Saha, B.C. & Bothast, R.J., 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), pp.3165–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2016].
- Saha, R. et al., 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4), pp.303–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733623> [Accessed February 2, 2016].
- Saito, A. et al., 1998. glkA is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology*, 180(11), pp.2911–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603881> [Accessed June 13, 2016].
- Saito, A. et al., 2008. The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 11), pp.3358–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957589>.
- Saito, A. et al., 2007. The dasABC gene cluster, adjacent to dasR, encodes a novel ABC transporter for the uptake of N,N'-diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied and environmental microbiology*, 73(9), pp.3000–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1892892&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed March 3, 2016].
- Sampedro, J. & Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. *Genome biology*, 6(12), p.242. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1414085&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed November 4, 2015].
- Santos, C.A. et al., 2016. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1  $\beta$ -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. *Biotechnology for biofuels*, 9, p.71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4802607&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed May 10, 2016].
- Saritha Mohanram, V.R., 2015. Beta-Glucosidase: Key Enzyme in Determining Efficiency of Cellulase and Biomass Hydrolysis. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 05(01). Available at:

[http://www.omicsonline.org/bioprocessing-biotechniques-abstract.php?abstract\\_id=36527](http://www.omicsonline.org/bioprocessing-biotechniques-abstract.php?abstract_id=36527)  
[Accessed May 5, 2016].

- Scheible, W.-R. et al., 2003. An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *The Plant cell*, 15(8), pp.1781–1794.
- Scheller, H.V. & Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, pp.263–89. Available at: [http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-042809-112315?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=arplant](http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-042809-112315?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=arplant) [Accessed March 4, 2016].
- Schlösser, A. & Schrempf, H., 1996. A lipid-anchored binding protein is a component of an ATP-dependent cellobiose/cellotriose-transport system from the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 242(2), pp.332–338.
- Schlösser, A., Kampers, T. & Schrempf, H., 1997. The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *Journal of Bacteriology*, 179(6), pp.2092–2095.
- Schlösser, A. et al., 1999. Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), pp.2636–2643.
- Schlösser, A., Aldekamp, T. & Schrempf, H., 2000. Binding characteristics of CebR, the regulator of the ceb operon required for cellobiose/cellotriose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), pp.127–132.
- Schlösser, A., Kampers, T. & Schrempf, H., 1997. The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *Journal of bacteriology*, 179(6), pp.2092–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=178941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 13, 2016].
- Seipke, R.F. et al., 2011. The plant pathogen *Streptomyces scabies* 87-22 has a functional pyochelin biosynthetic pathway that is regulated by TetR- and AfsR-family proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 9), pp.2681–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757492> [Accessed May 31, 2016].
- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M. & Hutchings, M.I., 2012. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), pp.862–876.
- Seipke, R.F. & Loria, R., 2009. Hopanoids are not essential for growth of *Streptomyces scabies* 87-22. *Journal of bacteriology*, 191(16), pp.5216–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2725584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 13, 2016].
- Seipke, R.F. & Loria, R., 2008. *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *Journal of bacteriology*, 190(23), pp.7684–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2583622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 13, 2016].
- Seki-Asano, M. et al., 1994. Isolation and characterization of new 18-membered macrolides FD-891 and FD-892. *The Journal of antibiotics*, 47(11), pp.1226–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002384> [Accessed February 24, 2016].
- Shapiro, S. (Stuart), 1989. *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, CRC Press.
- Shu, D. et al., 2009. afsQ1-Q2-sigQ is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(6), pp.1149–60. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949475> [Accessed June 24, 2016].
- Singhania, R.R. et al., 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource technology*, 127, pp.500–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23069613> [Accessed March 30, 2016].
- Skaar, E.P., 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS pathogens*, 6(8), p.e1000949. Available at: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371%2Fjournal.ppat.1000949> [Accessed July 5, 2015].
- Sola-Landa, A., Moura, R.S. & Martín, J.F., 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), pp.6133–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730372> [Accessed June 14, 2016].
- Sørensen, A. et al., 2013. Fungal Beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3(3), pp.612–31. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/3/612/htm> [Accessed March 17, 2016].
- Souza, F.H.M. et al., 2014. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, pp.1–10. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714001064> [Accessed May 5, 2016].
- Souza, F.H.M. et al., 2013. Glucose and xylose stimulation of a  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: A kinetic and biophysical study. *Journal of molecular catalysis*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600060621> [Accessed May 10, 2016].
- Souza, F.H.M. et al., 2010. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, 45(2), pp.272–278. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511309003079> [Accessed May 3, 2016].
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084388> [Accessed June 8, 2016].
- Subramoni, S. et al., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in plant science*, 5(July), p.322. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086400&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086400&tool=pmcentrez&render_type=abstract).
- Swiatek, M.A. et al., 2012. Functional Analysis of the N-Acetylglucosamine Metabolic Genes of *Streptomyces coelicolor* and Role in Control of Development and Antibiotic Production. *Journal of Bacteriology*, 194(5), pp.1136–1144. Available at: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.06370-11> [Accessed July 13, 2016].
- Światek, M.A. et al., 2012. Engineering of N-acetylglucosamine metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and an unsuspected role of NagA in glucosamine metabolism. *Bioengineered*, 3(5).
- Tateno, M., Brabham, C. & Debolt, S., 2016. Cellulose biosynthesis inhibitors - A multifunctional toolbox. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), pp.533–542.
- Tegg, R.S. et al., 2013. Enhanced resistance to the cellulose biosynthetic inhibitors, thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* mutants, also provides specific co-resistance to the auxin transport inhibitor, 1-NPA. *BMC plant biology*, 13(1), p.76. Available at:

- <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-13-76> [Accessed May 18, 2016].
- Tegg, R.S. et al., 2016. Mechanisms of thaxtomin A-induced root toxicity revealed by a thaxtomin A sensitive *Arabidopsis* mutant (ucu2-2/gi-2). *Plant cell reports*, 35(2), pp.347–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26518425> [Accessed May 17, 2016].
- Tegg, R.S. et al., 2005. Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: Calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant and Cell Physiology*, 46(4), pp.638–648.
- Tenconi, E. et al., 2013. Use of red autofluorescence for monitoring prodiginine biosynthesis. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), pp.138–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517679>.
- Teugjas, H. & Väljamäe, P., 2013a. Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), p.104. Available at: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-104> [Accessed May 2, 2016].
- Teugjas, H. & Väljamäe, P., 2013b. Selecting  $\beta$ -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), p.105. Available at: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-105> [Accessed April 26, 2016].
- Thaxter, R., 1890. The potato scab. *Annual report Conn. Agric. Exp. Stn*, pp.80–95.
- Tierrafria, V.H. et al., 2011. Disruption of the siderophore-binding desE receptor gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in impaired growth in spite of multiple iron-siderophore transport systems. *Microbial biotechnology*, 4(2), pp.275–85. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3818867&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3818867&tool=pmcentrez&render_type=abstract) [Accessed May 31, 2016].
- Tiffert, Y. et al., 2008a. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 67(4), pp.861–880. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2007.06092.x> [Accessed June 29, 2016].
- Tiffert, Y. et al., 2008b. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular microbiology*, 67(4), pp.861–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179599> [Accessed June 14, 2016].
- Tolonen, A.C., Chilaka, A.C. & Church, G.M., 2009. Targeted gene inactivation in *Clostridium phytofermentans* shows that cellulose degradation requires the family 9 hydrolase Cphy3367. *Molecular Microbiology*, 74(6), pp.1300–1313. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2009.06890.x> [Accessed June 23, 2016].
- Trüper, H.G., 2008. Against conservation of specific epithets formed wrongly as nominative nouns in apposition. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 6), pp.1508–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523205> [Accessed January 6, 2016].
- Truper, H.G. & De'clari, L., 1997. Taxonomic Note: Necessary Correction of Specific Epithets Formed as Substantives (Nouns) "in Apposition." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), pp.908–909. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-47-3-908> [Accessed November 23, 2015].
- Tsujibo, H. et al., 2004. Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *Journal of*

- bacteriology*, 186(4), pp.1029–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=344215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2016].
- Uchima, C.A. et al., 2011. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(6), pp.1761–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057947> [Accessed May 5, 2016].
- Uchiyama, T., Miyazaki, K. & Yaoi, K., 2013. Characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *The Journal of biological chemistry*, 288(25), pp.18325–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3689974&tool=pmcentrez&renderertype=abstract> [Accessed May 5, 2016].
- Uchiyama, T., Yaoi, K. & Miyazaki, K., 2015. Glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase retrieved from a Kusaya gravity metagenome. *Frontiers in microbiology*, 6, p.548. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00548/abstract> [Accessed May 3, 2016].
- VanEtten, H.D. et al., 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *The Plant cell*, 6(9), pp.1191–1192. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160512&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2015].
- Viens, P. et al., 2015. Uptake of chitosan-derived D-glucosamine oligosaccharides in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS microbiology letters*, 362(9). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837815> [Accessed October 27, 2015].
- Voragen, A.G.J. et al., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), pp.263–275. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11224-009-9442-z> [Accessed March 4, 2016].
- Wach, M.J. et al., 2007. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. *Archives of Microbiology*, 188(1), pp.81–88.
- Waksman, S.A. & Henrici, A.T., 1948. Family II. Actinomycetaceae Buchanan and family Streptomycetaceae Waksman and Henrici. In Williams & Wilkins, ed. *Bergey's Manual of Determinative Microbiology*. Baltimore, pp. 892–980.
- Wang, H. et al., 2013. Electrochemical Determination of Glycoalkaloids Using a Carbon Nanotubes-Phenylboronic Acid Modified Glassy Carbon Electrode. *Sensors*, 13(12), pp.16234–16244. Available at: <http://www.mdpi.com/1424-8220/13/12/16234/> [Accessed July 18, 2016].
- Wang, M. et al., 2013. The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(4), pp.491–500. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.3987> [Accessed May 2, 2016].
- Wang, R. et al., 2013. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 87(1), pp.30–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106203> [Accessed June 24, 2016].
- Van Wezel, G.P. et al., 2004. GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 55(2), pp.624–636. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2004.04413.x> [Accessed June 10, 2016].
- van Wezel, G.P. et al., 1997. The malEFG gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Molecular & general genetics : MGG*, 254(5), pp.604–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197422> [Accessed March 3, 2016].

- van Wezel, G.P. & McDowall, K.J., 2011. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports*, 28(7), pp.1311–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21611665> [Accessed May 2, 2016].
- Wildermuth, H. & Hopwood, D.A., 1970. Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of general microbiology*, 60(1), pp.51–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5488466> [Accessed May 26, 2016].
- Wilkens, S., 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports*, 7, p.14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4338842&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed February 12, 2016].
- Wolanski, M. et al., 2011. The Level of AdpA Directly Affects Expression of Developmental Genes in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 193(22), pp.6358–6365. Available at: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.05734-11> [Accessed July 4, 2016].
- Xiao, X. et al., 2002. The novel *Streptomyces olivaceoviridis* ABC transporter Ngc mediates uptake of N-acetylglucosamine and N,N'-diacetylchitobiose. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 267(4), pp.429–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111550> [Accessed June 13, 2016].
- Xiao, Z. et al., 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113-116, pp.1115–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054257> [Accessed May 2, 2016].
- Xu, H. et al., 2011. Characterization of a glucose-, xylose-, sucrose-, and D-galactose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the alkalophilic bacterium *Bacillus halodurans* C-125. *Current microbiology*, 62(3), pp.833–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046402> [Accessed May 6, 2016].
- Yamanaka, K. et al., 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 9), pp.2899–905. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151202> [Accessed May 31, 2016].
- Yan, N., 2015. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), pp.257–283. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biophys-060414-033901> [Accessed June 13, 2016].
- Yan, T.R. & Lin, C.L., 1997. Purification and characterization of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(6), pp.965–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214755> [Accessed May 3, 2016].
- Yang, F. et al., 2015. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(21), pp.8903–15. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-6619-9/fulltext.html> [Accessed May 6, 2016].
- Yang, J., Tauschek, M. & Robins-Browne, R.M., 2011. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends in Microbiology*, 19(3), pp.128–135.
- Yang, Y. et al., 2015. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1  $\beta$ -glucosidases. *Scientific reports*, 5, p.17296. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4658561&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed May 3, 2016].
- Yao, L.-L. et al., 2014. GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in the actinomycete *Saccharopolyspora erythraea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(18), pp.7935–7948.

- Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5878-1> [Accessed June 29, 2016].
- Yaxley, A.M., 2009. Study of the complete genome sequence of *Streptomyces scabies* (or *scabiei*) 87.22. Available at: [http://wrap.warwick.ac.uk/3832/1/WRAP\\_THESIS\\_Yaxley\\_2009.pdf](http://wrap.warwick.ac.uk/3832/1/WRAP_THESIS_Yaxley_2009.pdf) [Accessed May 31, 2016].
- Yoon, V. & Nodwell, J.R., 2014. Activating secondary metabolism with stress and chemicals. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp.415–424.
- Zanoelo, F.F. et al., 2004. Beta-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS microbiology letters*, 240(2), pp.137–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522500> [Accessed May 5, 2016].
- Zhao, J. et al., 2007. An *adpA* homologue in *Streptomyces avermitilis* is involved in regulation of morphogenesis and melanogenesis. *Chinese Science Bulletin*, 52(5), pp.623–630. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11434-007-0105-4> [Accessed June 26, 2016].
- Zhou, C. & Wu, Q., 2012. Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies. In *Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications*. InTech. Available at: <http://www.intechopen.com/books/nanocrystals-synthesis-characterization-and-applications/recent-development-in-applications-of-cellulose-nanocrystals-for-advanced-polymer-based-nanocomposit> [Accessed June 20, 2016].
- Zhu, D. et al., 2005. Expression of the *melC* operon in several *Streptomyces* strains is positively regulated by *AdpA*, an AraC family transcriptional regulator involved in morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 187(9), pp.3180–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838045> [Accessed June 26, 2016].
- Zhu, H., Sandiford, S.K. & Van Wezel, G.P., 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), pp.371–386.