



HAL
open science

Variabilité génétique chez la bactérie radiorésistante *Deinococcus radiodurans* : la recombinaison entre séquences répétées et la transformation naturelle

Solenne Ithurbide

► **To cite this version:**

Solenne Ithurbide. Variabilité génétique chez la bactérie radiorésistante *Deinococcus radiodurans* : la recombinaison entre séquences répétées et la transformation naturelle. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112193 . tel-01374867

HAL Id: tel-01374867

<https://theses.hal.science/tel-01374867v1>

Submitted on 2 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 426
GÈNES GÉNOMES CELLULES

Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Solenne ITHURBIDE

Variabilité génétique chez la bactérie radiorésistante
Deinococcus radiodurans :
La recombinaison entre séquences répétées et la
transformation naturelle

Soutenue le 23 Septembre 2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Suzanne SOMMER	Professeur à l'Université Paris-Sud, FR
Rapporteurs :	Ivan MATIĆ David LEACH	Directeur de recherche, INSERM, FR Professeur à l'Université d'Edimbourg, UK
Examineurs :	Pablo RADICELLA François LECOINTE Bénédicte MICHEL	Directeur de recherche, CEA, FR Chargé de recherche, INRA, FR Directrice de recherche, CNRS, FR

Alors! Tu trouves?????

Remerciements

Voilà le temps des remerciements, la dernière page de quatre années de thèse que je pourrai résumer par ces quelques mots : plaisir, souffrance, doutes, échecs, persévérance, succès, échanges, maturité, stress, passion, lassitude, ténacité, ... c'est ça la recherche, c'est échouer ou perdre courage un jour tout en sachant que vous serez à la paillasse le lendemain matin, c'est un paradoxe en soi !

Je remercie tout d'abord tous les membres de mon jury, Ivan Matić, Pablo Radicella, Francois Lecointe, David Leach et Bénédicte Michel, pour avoir accepté d'examiner mon travail et d'avoir accepté de se déplacer pour ma soutenance, même de loin. J'ai eu l'occasion de tous vous écouter ou d'échanger avec vous durant des congrès. Ce sont des chercheurs comme vous qui me donnent envie de continuer à faire ce métier malgré le chemin difficile, et on me l'a répété tous les jours de ma thèse ! J'avais donc à cœur de réunir des personnes qui m'ont inspirées et ayant une grande expertise scientifique dans la thématique que j'ai développée durant ma thèse. J'espère que vous aurez plaisir à lire ce manuscrit.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée durant ces 4 années :

Ma directrice de thèse, Suzanne, pour sa bienveillance. J'ai pu rencontrer Suzanne en Master lors des différents enseignements qu'elle donnait et notamment sur la réparation de l'ADN, un de mes sujets favoris. J'ai intégré son équipe en stage de Master2 puis j'ai pu y poursuivre ma thèse. Je la remercie de m'accepter avec mon caractère et de me faire confiance dans mon travail. Ce travail a été riche en rebondissement mais notre ténacité a été fructueuse et les résultats originaux illustrés dans cette thèse en valaient la peine. Merci également pour ta disponibilité et ton soutien pendant la rédaction de cette thèse, on a formé une vraie équipe ! J'espère que tu te souviendras de ta dernière thésarde avec un bon souvenir. Je te souhaite tout l'épanouissement possible pour ta retraite et beaucoup de voyages.

Pascale, qui m'a encadrée, soutenue, encouragée au quotidien et grâce à qui j'ai pu m'épanouir dans mon travail. Merci de m'avoir fait confiance dans mon travail et donné l'autonomie dont j'ai besoin et d'avoir été disponible pour moi à tout moment. Ne te surmène pas trop !

Alice, avec qui on s'est serré les coudes durant notre thèse, et c'est pas facile tous les jours... surtout à la fin ... merci pour tous les moments passés au labo et en dehors et j'espère qu'il y en aura d'autres. Mauvaise nouvelle, tu vas devoir te débarrasser de ta collection de boulettes de papier d'alu !! et je sais que tu en as BEAUCOUP !

Fanny pour son expérience de thésarde, et de postdoc, pour tous les trucs et astuces et SURTOUT pour m'avoir fait découvrir les tableaux croisés dynamiques sur Excell, ça a révolutionné ma thèse !!

Geneviève pour son aide durant cette dernière année, et la rigueur de son travail.

Ainsi que les autres membres de l'équipe : Claire, Cécile et les dernières arrivées : Martine et Laura, avec lesquelles j'ai eu toujours beaucoup de plaisir à discuter de science et de la vie et avec qui j'ai passé d'excellents moments au quotidien et lors des événements célébrés autour d'innombrables gourmandises. Sans oublier les stagiaires Fabien, Yannick, Eslande, Abdou et Gwenolah.

François et Fabrice, mes tuteurs de thèse, pour leur conseils,

Adriana, pour ses conseils avisés sur mon travail, ses critiques, son aide à la rédaction de l'article, un vrai soutien et un exemple pour toute l'équipe,

Corinne pour toutes les commandes de litres, et de litres, et de litres, et de litres de milieu que je lui ai commandés.

Mer collaborateurs, Sophie Quevillon-Cherruel et Johnny Lisboa, avec qui j'ai pu apprendre beaucoup de choses sur la transformation.

Florence qui m'a formée en biochimie et à la manipulation de la radioactivité. Une vraie récréation pour moi entre mes étalements de boîtes et un vrai plaisir de par sa bonne humeur et sa grande pédagogie.

Je remercie également tous mes collègues encadrants de l'équipe iGEM Paris-Saclay : Philippe, Claire, Olivier, et plus particulièrement Jean-Luc pour sa culture scientifique, sa bienveillance, sa confiance et son humour ainsi que Sylvie, pour toutes nos conversations hors IGEM. Ces années avec vous ont été très enrichissantes et vous avez vraiment fait partie de mon évolution en tant que chercheur, encadrant ainsi que sur le plan personnel. Merci pour tout.

Un grand MERCI à Hélène et Indiana, il n'y a que des thésards ou ancien thésards qui savent ce que c'est une thèse, il faut les avoir éprouvés pour savoir ce que sont réellement les sentiments à travers lesquels passe un thésard !! Alors à tour de rôle, on a fait le bureau des plaintes mais toujours dans la joie et l'humour ! Merci pour tous ces moments passés ensemble (sauf pour les huitres) et je ne doute pas qu'il y en aura bien d'autres. Bonne chance dans vos vies professionnelles qu'elles soient en recherche ou ailleurs. Moi le privé ? ..jamais de la vie qu'on disait et puis qui sait, la crêperie ça reste un bon plan B !!! et dans vos vies personnelles bien sûr, avec un beau blond saxophoniste à chemise bleue !

Un petit clin d'œil au reste de la GCDE team, Wassila (et Enrique), Mélanie, Maël, François, Tarik, Justine, que j'ai rencontrés pendant le Master et on a VRAIMENT passé d'excellents moments ensemble. J'espère qu'on trouvera tous réussite et épanouissement dans nos vies professionnelles et qu'on continuera à se soutenir.

Merci à toi *Deinococcus radiodurans*, même si tu pues pas mal quand même, ta douce couleur rosée va me manquer !

Je remercie également ceux qui me supportent depuis de nombreuses années maintenant, mes parents, Jocelyne & Didier, sans qui je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui, pour leur amour et leur soutien, même inavoués. Mes (très) grands frères Christophe & Jérémy, qui pensent encore qu'on passe une thèse sur les bancs de la fac ! Mais ça y'est c'est fini, je ne suis plus étudiante et pour rappel, votre petite sœur a 27 ans maintenant !! Mes amis de loooooooooooooog date avec qui je partage ma vie dans les bons moments mais aussi les mauvais (enfin j'essaie). Les filles, l'm Back ! Sandra L. pour sa contribution à mon épanouissement personnel. Et pour finir celui qui colore ma vie depuis 3 ans et pour les années à venir, celui qui d'un seul mot me réconforte et me soutient dans toutes les épreuves, Damien.

(Aller,.... j'ose ! Merci à moi parce-que je suis super contente d'être arrivée jusqu'au bout malgré les embuches et parce que cette thèse est très symbolique pour moi ! C'est maintenant que tout commence ! I DID IT !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!)

Merci à vous tous,

Solenne

Sommaire

Liste des principales abréviations.....	5
Liste des figures et tableaux.....	6
Résumé	11
Summary.....	12
Avant propos.....	13
Introduction	
<i>Deinococcus radiodurans</i> , un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour	17
I. La bactérie <i>Deinococcus radiodurans</i>	19
1. Origine et phylogénie	19
2. Morphologie et division cellulaire.....	21
3. Génome et outils génétiques	21
II. Une résistance exceptionnelle aux agents génotoxiques.....	22
1. Lésions engendrées par le métabolisme cellulaire et les agents génotoxiques	22
2. Des records de résistance.....	25
3. Un véritable kit de survie	27
A. Un nucléoïde compact.....	27
B. Une protection des protéines contre l'oxydation	28
C. Une réponse au stress et des protéines originales	30
D. Des mécanismes efficaces de réparation de l'ADN.....	35
III. Maintien de l'intégrité du génome chez <i>D. radiodurans</i>.....	37
1. Réparation des cassures double brin de l'ADN chez <i>D. radiodurans</i>	39
A. Mécanismes RecA-dépendants	39
a) La recombinaison homologue	39
b) La réparation par synthèse massive d'ADN et appariement des brins d'ADN néosynthétisés : l'ESDSA (extended synthesis-dependent strand annealing)	51
B. Mécanismes RecA-indépendants de réparation des cassures double brin de l'ADN	53
a) Le SSA (Single Strand Annealing)	53
b) Le NHEJ	58
2. Réparation des bases et des nucléotides endommagés	60
A. Réparation par excision des bases endommagées : « Base excision repair » (BER)	60

B.	Réparation des nucléotides endommagés : « Nucleotide excision repair » (NER)	62
C.	Correction des mésappariements : « Mismatch repair » (MMR).....	64
3.	Blocage de la fourche de réplication au niveau de lésions encombrantes et mécanismes de sauvetage de la fourche	66
IV.	Plasticité du génome chez <i>D. radiodurans</i>	72
1.	Les éléments mobiles	72
2.	L'intégration de matériel génétique exogène et la transformation.....	78
3.	La recombinaison entre séquences répétées.....	80
V.	Objectifs de cette thèse	87
Chapitre 1		
Les mécanismes d'instabilité génétique entre séquences répétées directes chez <i>D. radiodurans</i>: rôle majeur de l'appariement simple brin dans la recombinaison RecA-indépendante entre séquences répétées		
		89
I.	Introduction	91
1.	La taille des séquences répétées et des régions espaceurs influence la recombinaison entre séquences répétées.....	91
2.	Les mécanismes à l'origine d'instabilité génétique entre les séquences répétées	93
3.	Stratégie d'étude de l'instabilité génétique entre séquences répétées chez <i>D. radiodurans</i>	97
II.	Résultats	101
III.	Résultats complémentaires	103
1.	Tentative de construction d'un mutant $\Delta ruvC$	103
2.	Test génétique de l'essentialité du gène <i>ruvC</i>	104
IV.	Récapitulatif des résultats obtenus	109
Chapitre 2		
Rôle de la protéine DprA dans la transformation par de l'ADN génomique et de l'ADN plasmidique chez <i>D. radiodurans</i>		
		113
Avant propos		
		115
I.	INTRODUCTION	117
1.	La transformation naturelle à travers les espèces bactériennes	117
2.	La transformation, étape par étape	119
A.	Internalisation de l'ADN extracellulaire	119
a)	Les pseudopili dérivés des systèmes de formation des pili de type IV (T4P) et de sécrétion de type II (T2SS) et IV (T4SS).....	119

b) Fixation, internalisation et translocation de l'ADN	121
B. Devenir de l'ADN internalisé	124
a) Protection de l'ADN transporté dans le milieu intracellulaire	124
b) Etablissement de l'ADN internalisé dans la cellule hôte Fixation, internalisation et translocation de l'ADN	126
3. Rôle de la protéine DprA dans la transformation	127
A. Découverte, distribution phylogénique, architecture structurale	127
B. Les rôles de DprA lors de la transformation.....	131
a) Fixation sur l'ADNsb entrant et protection contre la dégradation.	131
b) Levée de la barrière SSB et chargement de la recombinaise RecA.....	131
c) Le rôle de DprA dans la régulation de la compétence	134
4. <i>Deinococcus radiodurans</i> , une bactérie naturellement compétente	136
II. Problématique	137
III. Résultats et discussion	139
1. Etude du rôle de la protéine DprA dans la transformation chez <i>D. radiodurans</i>	139
A. Rôle de DprA dans la transformation par de l'ADN génomique	139
B. Rôle de DprA dans la transformation par de l'ADN plasmidique.....	142
2. Rôle des domaines N terminal et C terminal de la protéine ^{Dr} DprA dans la transformation chez <i>D. radiodurans</i>	145
A. Etude des domaines protéiques de ^{Dr} DprA	145
B. Complémentation inter-espèces.....	149
3. Transformation et radiorésistance.....	151
IV. Conclusion	152
V. Matériel et Méthodes.....	153
1. Tableau de souches et plasmides, culture des souches.....	153
2. Construction des souches et plasmides	153
A. Construction des simples et double mutants.....	153
B. Construction des souches pour l'expression de protéines ^{Dr} DprA tronquées	155
C. Construction des souches et plasmides pour la complémentation inter-espèces	155
3. Préparation des cellules compétentes et tests de transformation chromosomique et plasmidique.....	155
4. Irradiation et courbe de survie.....	157
5. Western Blot.....	157

Conclusion générale	159
Références bibliographiques	165
Annexes	189

Liste des principales abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNdb	: ADN double brin
ADNsb	: ADN simple brin
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
Δx	: inactivation du gène X
pb/kpb	: paires de bases / kilo paires de base
Gy /kGy	: gray / kilo Gray
h	: heure
DO₆₅₀	: densité optique à 650 nm
J/m²	: Joule par mètre carré
RDR	: Radiation Dessication Response
RDRM	: Radiation Dessication Response Motif
UV	: ultra-violet
ROS	: Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'Oxygène)
MMC	: Mitomycine C
MMS	: Méthyle méthane sulfonate
RH	: recombinaison homologue
ESDSA	: Extended Synthesis Dependant Strand Annealing
SSA	: Single Strand Annealing
SDSA	: Synthesis-Dependant Strand Annealing
BER	: Base Excision Repair
BIR	: Break induced replication
NER	: Nucleotide Excision Repair
NHEJ	: Non Homologous End Joining, recollement des extrémités
MMR	: Mismatch Repair
IS	: Insertion Sequence

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Arbre phylogénétique établi par comparaison des facteurs de transcription σ^{70}	
Figure 2 : Etapes de la division cellulaire chez <i>D. radiodurans</i> en phase exponentielle de croissance. ..	
Figure 3 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dommages cellulaires engendrés (Adapté de (Rodriguez & Redman, 2005, Meyer <i>et al.</i> , 2004))	
Figure 4 : Extrême résistance de la bactérie <i>D. radiodurans</i> (souche de référence ATCC 13939) (A) aux rayons gamma, (B) à la dessiccation (C) aux UV-C et (D) à la mytomycine C en comparaison à la bactérie <i>E. coli</i> (souche MG1655) (Slade & Radman, 2011).....	
Figure 5 : Structure du nucléoïde de <i>Rubrobacter radiotolerans</i> , <i>D. radiodurans</i> et <i>E. coli</i> . D'après (Zimmerman & Battista, 2005).....	
Figure 6 : Systèmes enzymatiques de traitement des espèces réactives de l'oxygène : réactions catalysées par les superoxide dismutases et les catalases	
Figure 7 : Rôle du Manganèse dans les mécanismes de protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS).	
Figure 8 : Motif RDRM chez <i>D. radiodurans</i> (Makarova <i>et al.</i> , 2007)	
Figure 9 : Modèle de régulation du régulon RDR par DdrO et IrrE chez <i>D. radiodurans</i> (Devigne <i>et al.</i> , 2015).....	
Figure 10: Cinétique de réparation des cassures de l'ADN après irradiation γ	
Figure 11: Les différentes étapes de la recombinaison homologe chez la bactérie <i>E. coli</i> (d'après (Mawer & Leach, 2014)).....	
Figure 12 : Modèle de reconnaissance des cassures double brin de l'ADN par RecN chez <i>D. radiodurans</i> (Pellegrino <i>et al.</i> , 2012).....	
Figure 13 : Maturation des extrémités 3' simple brin par le complexe RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008).....	
Figure 14 : Modèle structural de mécanisme d'action du complexe RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008).....	
Figure 15 : Formation des extrémités 3' simple brin par RecQ et RecJ dans la voie RecFOR de réparation des cassures de l'ADN (Morimatsu & Kowalczykowski, 2014).....	
Figure 16 : Modèle de recrutement de RecA par RecFOR chez <i>E. coli</i> (Handa <i>et al.</i> , 2009).	
Figure 17 : Extension de l'ADN hétéroduplex par le complexe RuvAB.	
Figure 18 : Résolution des jonctions de Holliday par RuvC.....	
Figure 19: « Break-Induced Replication » (BIR) et réparation des cassures double brin de l'ADN par SDSA « Synthesis-Dependent Strand Annealing » (d'après (Mawer & Leach, 2014))	
Figure 20: Etapes du mécanisme ESDSA chez <i>D. radiodurans</i> . (d'après (Zahradka <i>et al.</i> , 2006, Bentchikou <i>et al.</i> , 2010) ; (Bouthier de la Tour <i>et al.</i> , 2011)).....	
Figure 21 : Schématisation des évènements de Single Strand Annealing (SSA) interchromosomiques et intrachromosomiques.....	
Figure 22 : Implication de DdrB dans la transformation de <i>D. radiodurans</i> par de l'ADN plasmidique. ...	
Figure 23 : Deux modèles d'appariement d'ADN simple brin médié par DdrB (Sugiman-Marangos <i>et al.</i> , 2013).....	

Figure 24 : Voies de réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ chez les Eucaryotes (A) et chez <i>M. tuberculosis</i> et <i>B.subtilis</i> (B). (Brissett & Doherty, 2009).....	
Figure 25: Réparation des bases endommagées chez <i>E. coli</i> par excision de bases.....	
Figure 26 : Système d'excision des dimères de pyrimidines par UVDE chez <i>S. pombe</i> . (Yonemasu <i>et al.</i> , 1997).....	
Figure 27 : Réparation des dimères de thymine par excision de nucléotide (NER) chez <i>E. coli</i>	
Figure 28 : Réparation des mésappariements (MMR) chez <i>E. coli</i> . (Joseph <i>et al.</i> , 2006)	
Figure 29 : Voie RecFOR de sauvetage de fourches de réplication lors de la rencontre de lésions sur l'ADN matrice. (Michel <i>et al.</i> , 2007).....	
Figure 30 : Rôle d'UvrD dans la prise en charge des fourches de réplication bloquées (Michel <i>et al.</i> , 2007).....	
Figure 31: Initiation de la réparation des discontinuités simple brin par la voie RecFOR (adapté de (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003)).....	
Figure 32 : Principe de la synthèse translésionnelle (TLS) chez <i>E. coli</i> . (Fuchs & Fujii, 2013).	
Figure 33 : Le modèle « Replication fork collapse » ((Michel <i>et al.</i> , 2007))	
Figure 34 : Le modèle de réversion de fourche (Michel <i>et al.</i> , 2007).	
Figure 35 : Schéma de l'organisation de différents éléments mobiles intégrés dans un génome (Darmon & Leach, 2014).	
Figure 36 : Les différents mécanismes de transposition (Merlin & Toussaint, 1999).....	
Figure 37 : Schématisation du mécanisme d'excision / intégration de l' <i>ISDra2</i> (Adapté de (Ton-Hoang <i>et al.</i> , 2010))	
Figure 38 : Mécanismes de transfert horizontal de gènes chez les bactéries (Furuya & Lowy, 2006).	
Figure 39 : Modèles pour l'expansion des trinuécléotides (d'après (Jackson <i>et al.</i> , 2014)).	
Figure 40 : Principales hypothèses concernant la formation de duplications chromosomiques inversées liées à la présence de séquences palindromiques ou de séquences répétées inversées dans le chromosome (Darmon <i>et al.</i> , 2010).	84
Figure 41 : Modèle de délétion ou d'amplification de séquences répétées par recombinaison homologue.	
Figure 42 : Schématisation des évènements de Single Strand Annealing (SSA)	
Figure 43 : Glissements de polymérase pouvant se produire au niveau de séquences répétées (Bzymek & Lovett, 2001).	
Figure 44 : Modèles de délétion au niveau de séquences répétées lors de blocage de fourche (Bruand <i>et al.</i> , 2001).....	
Figure 45 : Modèle de délétion entre séquences répétées par Single Strand Annealing (Michel, 2000).	
Figure 46 : Schéma du système génétique utilisé pour étudier la recombinaison interplasmidique par (Daly <i>et al.</i> , 1994a).	
Figure 47 : Schéma de l'outil génétique utilisé pour mesurer la recombinaison inter ou intrachromosomique entre séquences répétées chez <i>D. radiodurans</i>	
Figure 48 : Non homogénéisation de la souche GY16221 Δ <i>ruvC</i>	
Figure 49 : Principe du test d'essentialité des gènes.	
Figure 50 : Homogénéisation de la souche GY16403 Δ <i>ruvC</i> Ω <i>cat/p15016</i> (<i>ruvC</i> ⁺).....	

Figure 51 : Viabilité conditionnelle des cellules de *D. radiodurans* exprimant le gène *ruvC* à partir d'un plasmide à réplication thermosensible.

Figure 52 : Suivi de la fréquence de transformation par de l'ADN génomique au cours du temps chez *D. radiodurans* (Tirgari & Moseley, 1980).

Figure 53 : Voies de transformation chez les bactéries Gram-positives et chez les bactéries Gram-négatives. (Dubnau, 1999)

Figure 54 : Schéma des principaux composants des systèmes de pili de type IV , d'un système de sécrétion de type II chez les bactéries Gram négatives et du système de pili de type IV chez les bactéries Gram positives et leur localisation dans l'enveloppe bactérienne (Melville & Craig, 2013).....

Figure 55 : Modèle des machineries d'intégration de l'ADN chez les bactéries Gram positives (*B. subtilis*) et Gram négatives (*N. gonorrhoeae*, *H. pylori*) (Kruger & Stingl, 2011)

Figure 56 : Complexe d'éclipse lors de la transformation chez *S. pneumoniae* (d'après (Attaiech, 2009) et (Mortier-Barriere *et al.*, 2007)).

Figure 57 : Etapes d'établissement de l'ADN plasmidique dans la cellule lors de la transformation impliquant une étape de SSA.

Figure 58 : Arbre phylogénétique représentant la répartition du gène *dprA* dans le monde bactérien (d'après (Mortier-Barriere *et al.*, 2007))

Figure 59 : Composition modulaire de la famille de DprA (Lisboa, 2013).....

Figure 60 : Conservation des domaines Rossmann Fold et variabilité des extra-domaines des DprA.

Figure 61 : Structure d'un dimère de DprA de *S. pneumoniae* et résidus impliqués dans diverses interactions (d'après (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012)).....

Figure 62 : Devenir de l'ADNsb internalisé durant la transformation génétique naturelle chez *S. pneumoniae* (Attaiech, 2009).

Figure 63 : L'induction de la compétence chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, des circuits similaires mais qui ont évolué indépendamment (Claverys *et al.*, 2006).

Figure 64 : Rôle de DprA dans la régulation de la compétence chez *S. pneumoniae* (Mirouze *et al.*, 2013).....

Figure 65 : Fréquence de transformation par de l'ADN génomique chez différentes souches mutantes de *D. radiodurans*.

Figure 66 : Fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique chez différentes souches mutantes de *D. radiodurans*.

Figure 67 : Effet de la délétion des domaines N-terminal ou C-terminal sur la fréquence de transformation par de l'ADN génomique ou plasmidique.

Figure 68 : Vérification de l'expression des protéines ^{Dr}DprA, ^{Dr}DprAΔCter et ^{Dr}DprAΔNter par Western Blot.....

Figure 69 : Test de complémentation d'un mutant ^{Dr}*dprA* par l'expression de ^{Sp}*dprA*.

Figure 70 : Courbe de survie d'une mutant *dprA* à l'exposition aux rayons γ.

Figure 71 : Stratégies de construction des souches et de plasmides pour l'étude du rôle de ^{Dr}DprA et de ses domaines N-terminal et C-terminal dans la transformation.

Tableau 1 : Exemples d'espèces de <i>Deinococcaceae</i> et diversité des lieux de découverte (Slade & Radman, 2011).	18
Tableau 2 : Protéines et gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN chez <i>D. radiodurans</i> (D'après (Slade & Radman, 2011)).	
Tableau 3: Fréquence de recombinaison entre deux séquences répétées chez différents organismes.	92
Tableau 4 : Récapitulatif des phénotypes observés dans ce travail sur la viabilité cellulaire et la fréquence de recombinaison entre séquences répétées chez <i>D.radiodurans</i>	
Tableau 5 : Mécanismes possibles de recombinaison entre les séquences répétées chez <i>D.radiodurans</i> en fonction des génotypes étudiés lors de ce travail.....	
Tableau 6 : Exemples de bactéries naturellement compétentes parmi les bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que dans le phylum Deinococcus-Thermus (d'après (Johnsborg <i>et al.</i> , 2007), actualisé en 2013 par (Lisboa, 2013)).....	
Tableau 7 : Gènes codant pour des homologues des systèmes d'internalisation de l'ADN chez <i>D.deserti</i> et <i>D.radiodurans</i>	
Tableau 8 : Souches d' <i>E.coli</i> et de <i>D.radiodurans</i> et plasmides utilisés dans ce travail.....	

Résumé

La bactérie *Deinococcus radiodurans* est connue pour sa capacité à résister à un grand nombre de traitements génotoxiques parmi lesquels on peut citer l'exposition aux rayons ionisants, aux ultraviolets, à la mitomycine C, à la dessiccation et au stress oxydant. Elle est capable lors d'une exposition à des doses extrêmes de rayons γ générant des centaines de cassures de l'ADN de reconstituer un génome intact en seulement 2 à 3 heures via un mécanisme original, l'ESDSA, impliquant une synthèse massive d'ADN pendant la phase de réparation des cassures de l'ADN. En plus de mécanismes efficaces de réparation de l'ADN, elle possède un kit de survie comprenant une compaction importante du nucléoïde, des mécanismes de protection des protéines contre l'oxydation, une réponse originale aux lésions de l'ADN et des protéines spécifiques induites après irradiation. Tous ces facteurs contribuent au maintien de l'intégrité du génome et à la survie de la cellule lors de l'exposition à différents agents génotoxiques. Souvent considéré comme un organisme ayant une stabilité génomique exceptionnelle, cette bactérie possède dans son génome un grand nombre de séquences répétées et des éléments mobiles et est par ailleurs naturellement compétente. Ce sont autant de facteurs pouvant participer à la variabilité génétique de cette espèce. Je me suis donc intéressée lors de ma thèse à deux processus pouvant participer à l'instabilité génétique chez *D. radiodurans* : la recombinaison entre séquences répétées et la transformation naturelle.

L'introduction dans le génome de *D. radiodurans* de séquences répétées directes de 438 pb séparées par des régions d'ADN d'une longueur allant de 1479 pb à 10 500 pb m'a permis de mettre en évidence le rôle majeur joué par l'appariement simple brin (Single Strand Annealing ou SSA) impliquant la protéine DdrB, spécifique des *Deinococcaceae*, dans la recombinaison « spontanée » entre les séquences répétées en absence de la recombinase RecA. L'absence de DdrB dans des souches déficientes pour la recombinaison augmente davantage la perte de viabilité observée dans ces souches ce qui suggère que le SSA participe à la prise en charge de fourches de réplication bloquées, source majeure d'instabilité génétique en absence de stress extérieur, si ces fourches ne peuvent être prises en charge par des voies impliquant des protéines de recombinaison.

Je me suis également intéressée à la transformation naturelle et aux protéines impliquées dans ce processus chez *D. radiodurans*. J'ai pu démontrer que la protéine DprA impliquée dans la protection de l'ADN simple brin et le chargement de RecA sur l'ADN simple brin internalisé lors de la transformation de nombreuses espèces comme *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* ou *Helicobacter pylori*, est également impliquée dans la transformation chez *D. radiodurans*. J'ai pu montrer également qu'en plus de jouer un rôle majeur dans la transformation par de l'ADN plasmidique, la protéine DdrB est impliquée dans la transformation par de l'ADN génomique si la protéine DprA est absente.

Summary

The bacterium *Deinococcus radiodurans* is known for its ability to withstand a large number of genotoxic treatments, including exposure to ionizing or ultraviolet radiation, mitomycin C, desiccation, and oxidative stress. It is able, upon exposure to extreme doses of γ -radiation generating hundreds of DNA breaks, to reconstitute an intact genome in only 2 to 3 hours via an ESDSA mechanism, involving massive DNA synthesis during DNA double strand break repair. Together with efficient DNA repair mechanisms, *D. radiodurans* possesses a survival kit comprising significant compaction of its nucleoid, protection mechanisms against protein oxidation, an original response to DNA damage and specific proteins induced after irradiation. All of these contribute to the maintenance of genomic integrity and cell survival upon exposure to various genotoxic agents. In spite of the idea that *D. radiodurans* is an organism with outstanding genomic stability, this bacterium has in its genome a large number of repeat sequences and mobile elements and is also naturally competent. All these factors contribute to the genetic variability of species. I was interested in two processes that can play a role in genetic variability in *D. radiodurans*: recombination between repeated sequences and natural transformation.

The introduction, into the genome of *D. radiodurans*, of 438 bp direct repeated sequences separated by DNA regions ranging from 1,479 bp to 10,500 bp in length allowed me to demonstrate the major role of Single Strand Annealing (SSA) involving the DdrB protein specific for *Deinococcaceae* in the "spontaneous" recombination between the repeated sequences in the absence of the RecA recombinase. The absence of DdrB in strains deficient for recombination further increased the loss of viability observed in these strains, suggesting that SSA is required for the management of blocked replication forks, a major source of genetic instability in the absence of external stress when these forks cannot be rescued by pathways involving recombination proteins.

I was also interested in the natural transformation and in proteins involved in this process in *D. radiodurans*. I demonstrated that DprA protein involved in DNA single strand protection and loading of RecA on single-stranded DNA internalized during transformation of many species such as *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, or *Bacillus subtilis*, is also involved in this process in *D. radiodurans*. I also showed that, in addition to playing a major role in transformation by plasmid DNA, DdrB is also involved in transformation by genomic DNA of cells devoid of the DprA protein.

Avant propos

Le génome, support de l'information génétique est essentiel à la vie des cellules et donc des organismes. Parce qu'il est transmis à la descendance, il est également essentiel à la survie des espèces. Le maintien de son intégrité physique et la stabilité de son contenu deviennent alors primordiaux. Cependant, à l'échelle de l'évolution, les espèces évoluent, convergent, divergent reflétant une évolution de leur génome, ce qui implique un juste équilibre entre stabilité et variabilité des génomes.

Il existe de nombreuses sources de dommages de l'ADN, regroupées sous le terme d'agents génotoxiques. Ils peuvent être endogènes comme la production par le métabolisme cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou bien exogènes comme l'exposition au rayonnement ultraviolet (UV), au rayonnement ionisant, ou encore à des produits chimiques. Ces traitements peuvent engendrer des modifications physico-chimiques de bases, créer des appariements non Watson-Crick et/ou des cassures simple ou double brin de l'ADN. Des contraintes physiques liées à la fixation des protéines sur l'ADN ou à la topologie de l'ADN et la présence de structures secondaires peuvent également perturber la réplication de l'ADN et engendrer des mutations. Les organismes ont développé des mécanismes permettant de réparer ces lésions ou de gérer ces contraintes de manière efficace. Certains organismes montrent d'ailleurs une incroyable capacité à résister à toutes sortes d'agents génotoxiques comme c'est le cas pour la bactérie *Deinococcus radiodurans*. Ces mécanismes permettent, la plupart du temps, une restauration à l'identique de la molécule d'ADN mais il est possible que cette réparation soit infidèle entraînant des mutations. Ces mutations, peuvent être ponctuelles (modification d'une base, substitution, petites insertions ou délétions) ou concerner des régions plus grandes (grandes insertions ou délétions, remaniements chromosomiques) et avoir un effet ou non sur la fonctionnalité des gènes touchés et sur le phénotype de l'organisme. Elles sont transmises à la descendance, et sont à l'origine d'une variabilité du génome à l'échelle de l'évolution.

D'autres mécanismes peuvent être également source d'instabilité génétique. Parmi ceux-ci, on peut citer la présence d'éléments mobiles qui se déplacent dans le génome, parfois après exposition à divers stress, pouvant aboutir à l'inactivation de gènes. On peut également citer le transfert horizontal de gènes, processus lors duquel du matériel génétique est transféré d'un organisme à un autre permettant à ce dernier d'acquérir une nouvelle information génétique que ce soit une version différente d'un gène qu'il possède déjà ou un nouveau gène. Un des processus aboutissant au transfert de gènes est la transformation lors de laquelle une bactérie, dite compétente, est capable d'internaliser de l'ADN présent dans le milieu extracellulaire et de l'intégrer dans son génome. La bactérie *D. radiodurans* est naturellement compétente et possède plusieurs familles d'éléments mobiles insérés dans son génome.

Souvent considéré comme un organisme ayant une stabilité génomique exceptionnelle, la bactérie *D. radiodurans* a dans son génome un grand nombre de séquences répétées ainsi que des éléments mobiles et est par ailleurs naturellement compétente. Ce sont autant de facteurs pouvant participer à la variabilité génétique de cette espèce. Je me suis donc intéressée lors de ma thèse à deux processus pouvant participer à l'instabilité génétique chez *D. radiodurans* : la recombinaison entre séquences répétées et la transformation naturelle.

Introduction

Deinococcus radiodurans,
un des organismes les plus
radiorésistants connus à ce
jour

Deinococcus species	Site(s) of isolation	Reference
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gamma-irradiated canned meat	(Anderson <i>et al.</i> , 1956)
	Ground beef and pork, the hides and hair of live beef, creeks	(Krabbenhoft <i>et al.</i> , 1965)
	Sawdust	(Ito, 1977)
	Air of clean rooms and laboratories of an institute	(Christensen & Kristensen, 1981)
	Clothes of people working in an institute	(Kristensen & Christensen, 1981)
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	Haddock tissue	(Davis <i>et al.</i> , 1963)
<i>Deinococcus radiophilus</i>	Mumbai duck in India	(Lewis, 1971)
	Hypersaline oil-polluted microbial mat in Saudi Arabia	(Abed <i>et al.</i> , 2007)
<i>Deinococcus proteolyticus</i>	Feces of a llama	(Kobakate <i>et al.</i> , 1973)
<i>Deinococcus grandis</i>	Tataouine desert	(Chanal <i>et al.</i> , 2006)
<i>Deinococcus geothermalis</i>	Hot spring in Italy and Portugal	(Ferreira <i>et al.</i> , 1999)
	Subterranean hot springs in Iceland	(Marteinsson <i>et al.</i> , 2001)
	Hydrothermal vents in Papua New Guinea	(Kimura <i>et al.</i> , 2003)
	Industrial paper machine water	(Saarimaa <i>et al.</i> , 2006)
<i>Deinococcus murrayi</i>	Hot springs in Portugal	(Ferreira <i>et al.</i> , 1999)
<i>Deinococcus indicus</i>	Groundwater in India	(Suresh <i>et al.</i> , 2004)
<i>Deinococcus frigens</i>	Antarctic soil	(Hirsch <i>et al.</i> , 2004)
<i>Deinococcus saxicola</i>	Antarctic sandstone	(Hirsch <i>et al.</i> , 2004)
<i>Deinococcus marmoris</i>	Antarctic marble	(Hirsch <i>et al.</i> , 2004)
	Surfaces of historic Scottish monuments	(Suihko <i>et al.</i> , 2007)
<i>Deinococcus hohokamensis</i>	Sonoran desert soil	(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus navajonensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus hopiensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus apachensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus maricopensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus pimensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus yavapaiensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus papagonensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus sonorensis</i>		(Rainey <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus deserti</i>	Sahara desert sand	(de Groot <i>et al.</i> , 2005)
<i>Deinococcus ficus</i>	Rhizosphere of <i>Ficus religiosa</i>	(Lai <i>et al.</i> , 2006)
<i>Deinococcus mumbaiensis</i>	Contaminated agar plate in India	(Shashidhar & Bandekar, 2006)
<i>Deinococcus peraridillitoris</i>	Coastal desert in Chile	(Rainey <i>et al.</i> , 2007)
<i>Deinococcus radiomollis</i>	Alpine environments	(Callegan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus claudionis</i>		(Callegan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus altitudinis</i>		(Callegan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus alpinitundrae</i>		(Callegan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus aquaticus</i>	Freshwater in South Korea	(Im <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus caeni</i>	Activated sludge in South Korea	(Im <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus aquatilis</i>	Water in Germany	(Kampfer <i>et al.</i> , 2008)
<i>Deinococcus aquiradiocola</i>	Radioactive site in Japan	(Asker <i>et al.</i> , 2009)
<i>Deinococcus xinjiangensis</i>	Desert soil in China	(Peng <i>et al.</i> , 2009)
<i>Deinococcus gobiensis</i>	Gobi desert	(Yuan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Deinococcus aerius</i>	High atmosphere in Japan	(Yang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Deinococcus piscis</i>	Marine fish	(Shashidhar & Bandekar, 2009)
<i>Deinococcus aetherius</i>	Stratosphere in Japan	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Deinococcus aerolatus</i>	Air in South Korea	(Yoo <i>et al.</i> , 2010)
<i>Deinococcus aerophilus</i>	Air in South Korea	(Yoo <i>et al.</i> , 2010)
<i>Deinococcus wulumuquiensis</i>	Radiation-polluted soil in China	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Deinococcus xibeensis</i>	Radiation-polluted soil in China	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Deinococcus guangriensis</i>	Radiation Centre of Guangxi University, Nanning, China	(Sun <i>et al.</i> , 2009)
<i>Deinococcus depolymerans</i>	Radioactive freshwater site in Japan	(Asker <i>et al.</i> , 2011)
<i>Deinococcus radioresistens</i>	Mountain soil, Korea	(Srinivasan <i>et al.</i> , 2015)

Tableau 1 : Exemples d'espèces de *Deinococcaceae* et diversité des lieux de découverte (Slade & Radman, 2011).

I. La bactérie *Deinococcus radiodurans*

1. Origine et phylogénie

Initialement nommée *Micrococcus radiodurans* de par sa forme sphérique, *D. radiodurans* R1 a été découverte en 1956 dans des boîtes de conserves « stérilisées » par irradiation aux rayons gamma (Anderson *et al.*, 1956). Elle fût renommée *Deinococcus radiodurans* après des études phylogénétiques basées sur l'analyse des ARN16s et classée dans une nouvelle famille, les *Deinococcaceae* qui compte aujourd'hui plus de 42 espèces répertoriées et une vingtaine de génomes séquencés (ou en cours de séquençage). Les *Deinococcaceae* ont été découvertes dans des environnements très variés (Tableau 1) parfois exposées à des conditions extrêmes allant des granits d'Antarctique (*D. radiophilus*, (Brooks & Murray, 1981)), des déserts du Sahara ou de Gobi (*D. deserti*, (de Groot *et al.*, 2005), *D. gobiensis*, (Yuan *et al.*, 2009)), des sources chaudes d'Italie (*D. geothermalis*, (Ferreira *et al.*, 1997)) ou encore de sites pollués radioactifs au Japon (*D. aquiradiocola*, (Asker *et al.*, 2009)). La plupart de ces espèces montre une forte résistance aux radiations et/ou à la dessiccation. D'autres analyses phylogénétiques ont permis de rapprocher *D. radiodurans* et *Thermus thermophilus* dans le même phylum *Deinococcus-Thermus* (Figure 1) (Griffiths & Gupta, 2004, Griffiths & Gupta, 2007)).

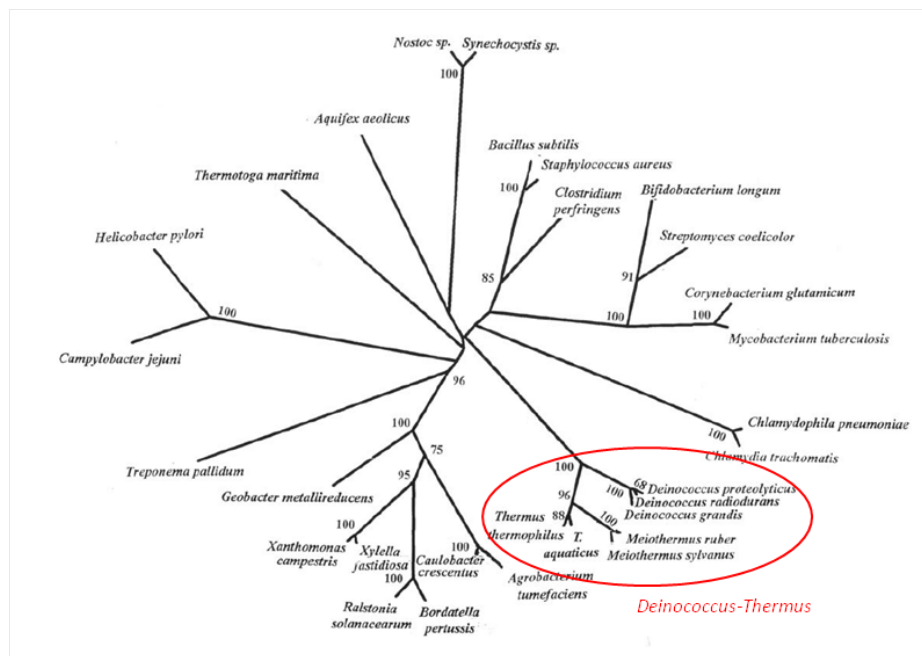


Figure 1 : Arbre phylogénétique établi par comparaison des facteurs de transcription σ^{70} . Le phylum *Deinococcus-Thermus* est entouré en rouge. Adapté de (Griffiths & Gupta, 2004).

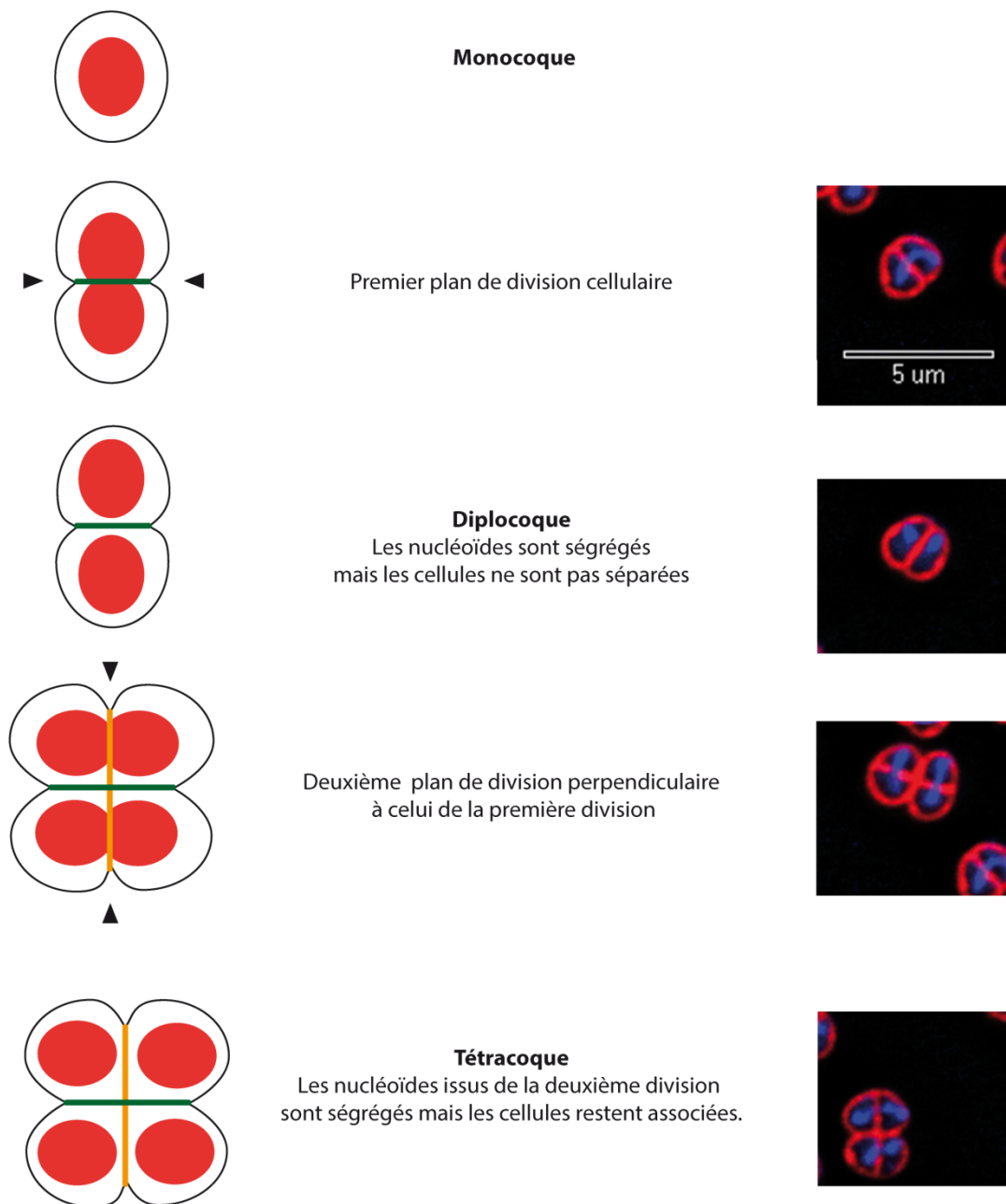


Figure 2 : Etapes de la division cellulaire chez *D. radiodurans* en phase exponentielle de croissance.

Panneau gauche : schémas de la division cellulaire chez *D. radiodurans* adaptés de (Passot *et al.*, 2015). Panneau droit : images de microscopie à fluorescence (collection du laboratoire). En bleu : coloration du nucléoïde au DAPI. En rouge : coloration des membranes au FM4-64. L'échelle est la même pour toutes les images de microscopie

2. Morphologie et division cellulaire

D. radiodurans, de forme sphérique d'environ 3 µm de diamètre, répond positivement à la coloration de Gram bien que la structure de sa membrane s'apparente davantage à celle des Gram négatives. Elle possède notamment une fine couche de peptidoglycane et une membrane externe de composition lipidique originale puisqu'elle comprend de la L-ornithine, un composé retrouvé très rarement dans les membranes des bactéries (Muller *et al.*, 1996, Farci *et al.*, 2014).

C'est une bactérie non motile et non sporulante. Elle est mésophile, aérobie obligatoire et se divise avec un temps de génération d'environ 80 minutes en culture liquide en milieu riche à 30°C et deux à trois jours sont nécessaires pour observer des colonies en culture sur milieu gélosé. Les colonies sont de couleur rose due aux pigments qu'elle produit dont majoritairement la deinoxanthine, un β-carotène jamais isolé auparavant (Lemee *et al.*, 1997).

Sa division cellulaire est différente de celle des autres coques. En effet, lorsqu'une première division est en cours, la seconde démarre sur un plan perpendiculaire au premier donnant lieu à une organisation des cellules en tétracoque (Figure 2). Les formes en monocoques sont rarement observées au microscope lors de l'analyse d'un échantillon de culture liquide.

3. Génome et outils génétiques

Le génome de *D. radiodurans*, très riche en GC (66,6%) a été entièrement séquencé en (White *et al.*, 1999) cependant, il ne s'agit pas de celui de la souche de référence R1 ATCC 13989 utilisée dans notre laboratoire. Certaines différences observées lors du re-séquençage de certains gènes au laboratoire a conduit notre équipe à envisager en collaboration avec IMAGIF un nouveau séquençage et une nouvelle annotation du génome de R1 ATCC 13989 (travail en cours).

Le génome de *D. radiodurans* est constitué de quatre molécules circulaires : deux chromosomes (2,64 Mpb et 412 Kpb), un mégaplasmide (177 Kpb) et un plasmide (45 Kpb), chacun présent en 4 à 10 exemplaires suivant le milieu de culture (Hansen, 1978, Harsojo *et al.*, 1981, Passot *et al.*, 2015).

Cette bactérie est naturellement transformable par de l'ADN chromosomique, plasmidique ou linéaire (Masters & Minton, 1992), ce qui a permis de développer des méthodes et des outils génétiques pour la construction de souches mutantes (Lecoite *et al.*, 2004, Meima *et al.*, 2001) ou pour l'expression conditionnelle de gènes (Nguyen *et al.*, 2009, Devigne *et al.*, 2015). Les gènes peuvent être facilement remplacés par un marqueur de sélection en transformant *D. radiodurans* par de l'ADN contenant le marqueur de sélection flanqué de régions amont et aval du locus à remplacer (Mennecier *et al.*, 2004). Selon le gène remplacé, l'étape la plus longue, du fait de la polyploïdie de *D.*

radiodurans, reste l'obtention de souches mutantes homozygotes par repiquages successifs sur milieu sélectif.

II. Une résistance exceptionnelle aux agents génotoxiques

1. Lésions engendrées par le métabolisme cellulaire et les agents génotoxiques

Le métabolisme cellulaire et l'exposition à des agents physiques ou chimiques peuvent être source de lésions dans l'ADN.

Une source importante de génotoxicité pour les espèces aérobies est le stress oxydant. L'oxygène est un oxydant puissant capable de piéger des électrons. Dans la cellule, l'oxygène réagit avec trois grands types de donneurs d'électrons : les centres métalliques des métalloprotéines, les flavines (FAD) des flavoprotéines, les quinones des chaînes respiratoires et les électrons qui peuvent fuir de la chaîne respiratoire (Imlay, 2015). Les formes réduites de l'oxygène sont très réactives, on parle d'espèces réactives de l'oxygène, ROS (Reactive Oxygen Species). Parmi ces ROS, générées par transferts successifs d'électrons à partir de la molécule de dioxygène on peut citer les ions superoxydes O_2^\bullet dont la durée de vie dans la cellule est relativement longue et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Figure 3). Les ions et les radicaux hydroxyles (HO^\bullet et HO^\ominus), les espèces les plus réactives, en plus d'être générés après des réductions successives de la molécule d' O_2 peuvent être formés par la réaction de H_2O_2 avec des ions ferriques Fe^{2+} présents dans la cellule (Réaction de Fenton) ou avec des ions superoxydes (Réaction de Haber Weiss) (Figure 3).

L'exposition à des agents externes tels que les rayons UV (Davies, 2003), les rayons gamma (von Sonntag, 2006), la dessiccation et les antibiotiques (Dwyer *et al.*, 2014, Gutierrez *et al.*, 2013) peuvent augmenter la quantité de ROS dans la cellule. L'oxygène singulet (1O_2), une autre espèce réactive de l'oxygène, est principalement produite dans le vivant suite à une exposition à des rayons lumineux tels que les rayons UV (Davies, 2003). La radiolyse de l'eau par les rayonnements ionisants entraîne la formation de radicaux HO^\bullet (von Sonntag, 2006).

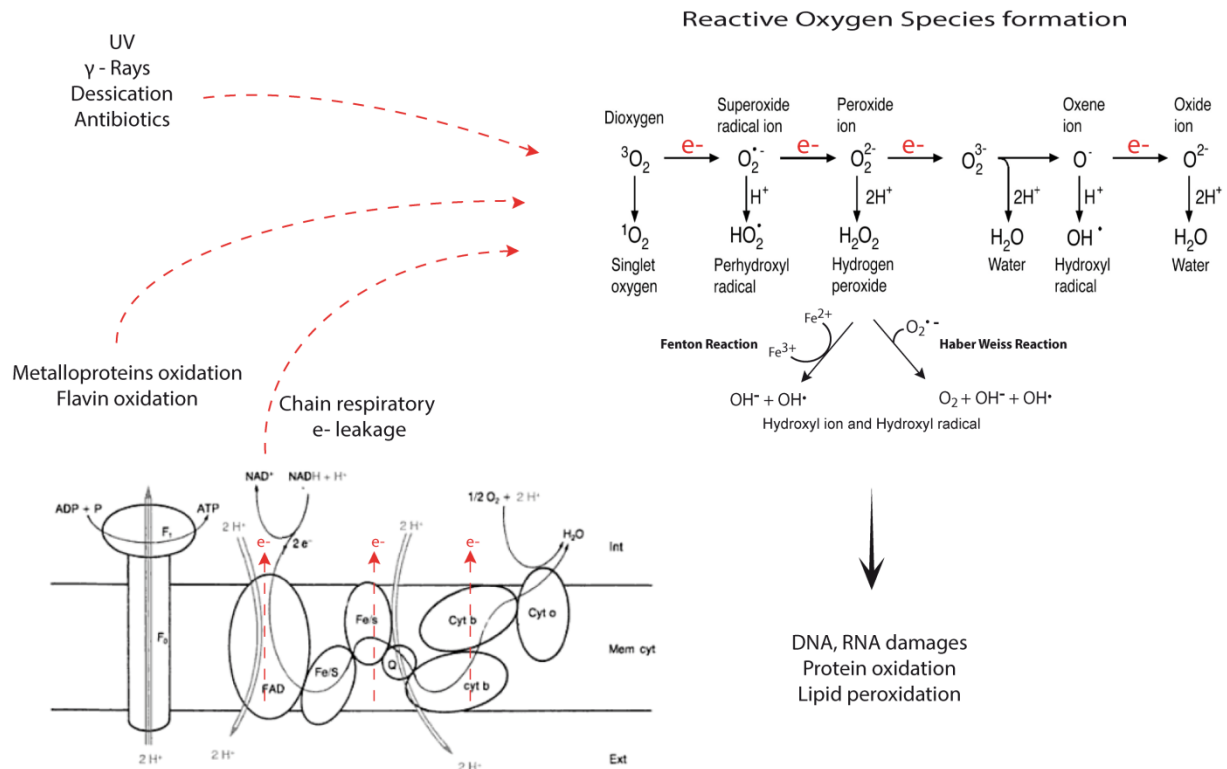


Figure 3 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dommages cellulaires engendrés (Adapté de (Rodriguez & Redman, 2005, Meyer *et al.*, 2004))

Ces ROS ont pour cible une grande partie des constituants cellulaires, à savoir l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides et entraînent par conséquent de graves dommages à la cellule.

Une centaine de types de bases oxydées ont été prédites et plus d'une vingtaine ont été observées *in vivo* (Cadet *et al.*, 2015, Cadet *et al.*, 2012) et ces modifications concernent les 4 bases. Parmi les modifications les plus connues, on peut citer les 8-oxo-guanines dont l'incorporation dans l'ADN a un fort pouvoir mutagène. Certaines oxydations de bases peuvent conduire à des liaisons covalentes entre des bases ou avec des chaînes latérales d'acides aminés (Cadet *et al.*, 2015, Cadet *et al.*, 2012). Les ROS attaquent également les sucres générant des cassures simple et/ou double brin de la double hélice d'ADN (Aziz *et al.*, 2012, Nikitaki *et al.*, 2015). Toutes ces lésions qui touchent l'ADN sont source de problèmes de réplication en provoquant la pause ou l'arrêt des fourches de réplication et elles peuvent être source de mutations.

L'oxydation cause également beaucoup de dommages aux protéines en provoquant de nombreuses modifications des acides aminés pouvant perturber la conformation ainsi que la fonction de la protéine, engendrer des fragmentations en peptides, ou des liaisons covalentes entre protéines ou d'autres molécules comme des lipides ou de l'ADN (Davies, 2005, Madian & Regnier, 2010, Hawkins

& Davies, 2001, Cabiscol *et al.*, 2000a, Cabiscol *et al.*, 2000b). La perte de fonctionnalité de protéines impliquées dans des mécanismes essentiels à la viabilité des cellules peut être source de dysfonctionnements cellulaires pouvant aboutir à la mort des cellules.

La peroxydation des lipides et notamment des lipides polyinsaturés entraînent une baisse de la fluidité des membranes, le désassemblage des protéines ancrées à la membrane et affecte leur intégrité (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007, Girotti, 1998).

Outre les dommages indirects via l'augmentation des ROS cellulaires, certains agents génotoxiques peuvent avoir une action directe sur l'ADN : les rayons γ génèrent des photons qui provoquent de manière directe des cassures simple et double brin de l'ADN (Nikitaki *et al.*, 2015), les rayons UV entraînent la formation de dimères de pyrimidines (Nikitaki *et al.*, 2015), la dessiccation prolongée entraîne des cassures de l'ADN, des agents chimiques tels que le méthyle méthane sulfonate (MMS) induisent des dommages au niveau des bases, la mitomycine C (MMC) réagit avec les guanines et provoque des pontages entre les brins d'ADN ce qui bloque les processus de réplication et de transcription (Rajski & Williams, 1998).

La diversité et la gravité des dommages cellulaires provoqués par les ROS ainsi que la génotoxicité de certains agents environnementaux nécessitent que les cellules développent des mécanismes de protection efficaces notamment pour réparer les dommages de l'ADN, cependant le niveau de résistance à ces différents agents génotoxiques est très variable selon les organismes.

2. Des records de résistance

D. radiodurans est capable de tolérer l'exposition à des doses élevées de divers agents génotoxiques et se situe très souvent parmi les organismes les plus résistants (Figure 4).

Sa propriété la plus connue est celle de résister à des doses extrêmes de rayonnement ionisant. Elle peut résister sans aucune perte de viabilité à des doses allant jusqu'à 6 kGy de rayonnement γ alors que quelques centaines de Gy sont suffisants pour tuer la bactérie *Escherichia coli*. Une dose de 6 kGy génère des centaines de cassures de l'ADN et la radiorésistance de *D. radiodurans* ne s'explique pas par une protection particulière contre les cassures puisqu'à dose égale, on observe le même nombre de cassures de l'ADN que chez *E. coli* (Gerard *et al.*, 2001). Elle est capable de réparer son génome en seulement deux à trois heures après une exposition à 6 kGy. Dans un milieu riche de culture, elle supporte également une exposition prolongée à une dose de 60 Gy/h sans aucun effet sur son taux de croissance (Lange *et al.*, 1998).

Cette bactérie est capable de supporter des doses de rayonnement UV-C allant jusqu'à 500 J/m² sans perte de viabilité alors qu'on estime que cette dose induit la formation de 5000 dimères de pyrimidines par équivalent génome (Sweet & Moseley, 1976, Battista, 1997). Quatre vingt dix minutes après une telle exposition, plus de 80% des dimères de thymines engendrés par les UV-C sont retrouvés dans le milieu de culture inclus dans des di- ou tri- nucléotides (Boling & Setlow, 1966).

Elle résiste également à une exposition de 10 minutes à une dose de 20 μ g/mL de MMC générant 100 à 200 pontages de l'ADN sans perte de viabilité (Kitayama, 1982) et présente 90% de viabilité après exposition pendant 60 minutes à 10 mM d'H₂O₂.

La bactérie *D. radiodurans* est également capable de survivre avec une viabilité supérieure à 85% après plus de 6 semaines de dessiccation avec un taux d'humidité de moins de 5% (Mattimore & Battista, 1996). Les cycles de réhydratation/dessiccation génèrent des cassures de l'ADN. Etant donné qu'au cours de l'évolution, elle n'a jamais été exposée à des doses de radiations de plusieurs kGy, il est proposé que le développement d'une résistance à des cycles de dessiccation/réhydratation soit à l'origine de cette extrême radiorésistance. En effet, il a été montré que les réponses en terme d'expression des gènes sont proches après irradiation et dessiccation, avec la mise en évidence de 72 gènes induits dans une réponse commune à chacun de ces traitements, suggérant que certains facteurs impliqués dans la radiorésistance auraient pu être acquis lors d'exposition à des cycles répétés de dessiccation-réhydratation (Mattimore & Battista, 1996, Tanaka *et al.*, 2004).

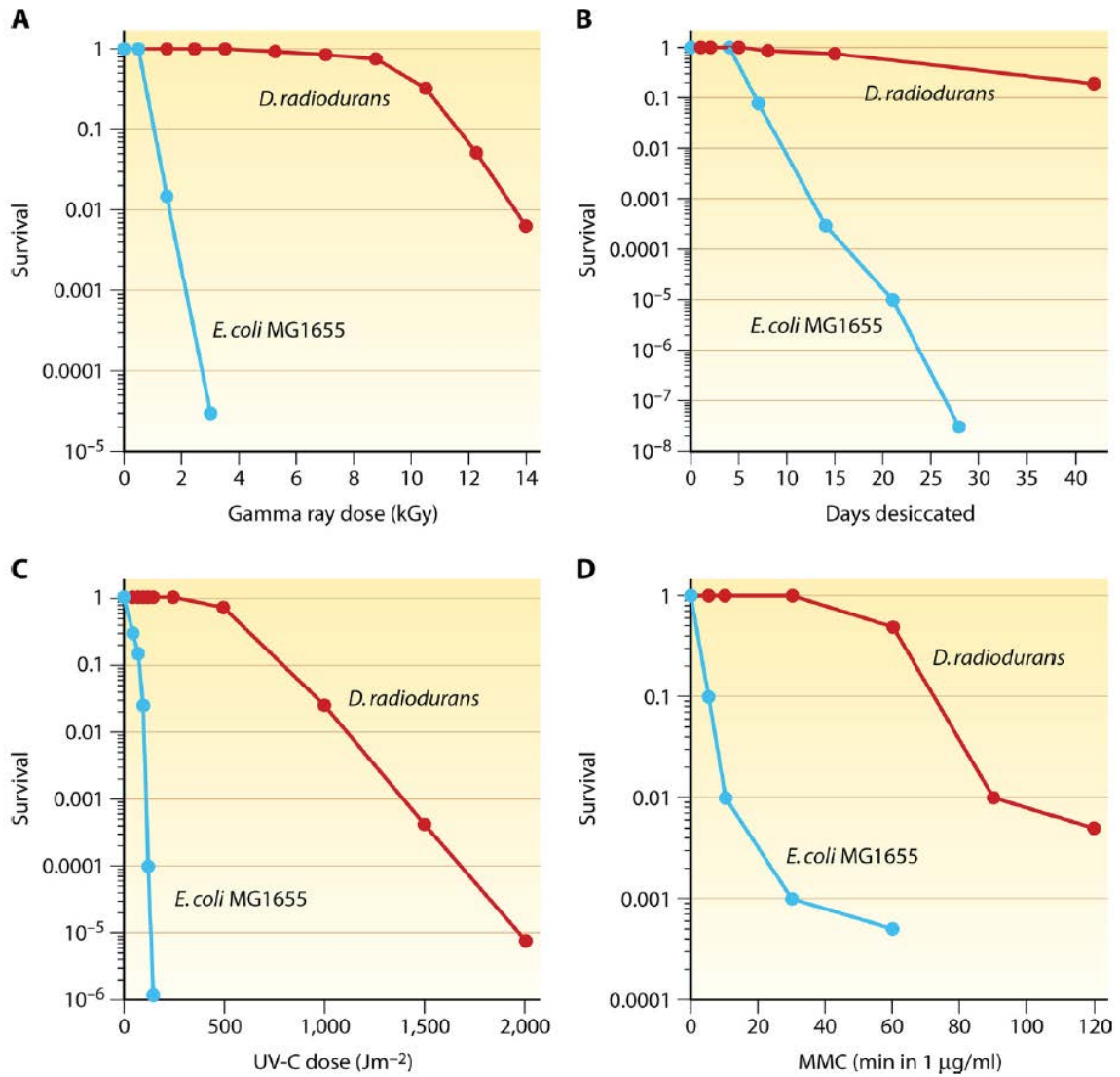


Figure 4 : Extrême résistance de la bactérie *D. radiodurans* (souche de référence ATCC 13939) (A) aux rayons gamma, (B) à la dessiccation (C) aux UV-C et (D) à la mytomycine C en comparaison à la bactérie *E. coli* (souche MG1655) (Slade & Radman, 2011).

3. Un véritable kit de survie

Au vu de ses capacités à résister à des doses extrêmes d'agents génotoxiques sans aucune perte de viabilité, *D. radiodurans* possède un véritable kit de survie que les chercheurs ne cessent d'explorer. C'est une adaptation globale de l'organisme et la présence de plusieurs mécanismes agissant de concert qui constituent ce kit de survie.

A. Un nucléoïde compact

Des observations en microscopie à transmission électronique (Levin-Zaidman *et al.*, 2003) ou confocale à épifluorescence (Zimmerman & Battista, 2005) montrent que le nucléoïde de *D. radiodurans* a une structure en anneau très compacte. Cette forte compaction semble être une caractéristique assez commune aux *Deinococcaceae* radiorésistants, elle est en effet retrouvée chez *D. proteolyticus* (Zimmerman & Battista, 2005), *D. geothermalis* (Zimmerman & Battista, 2005) et *D. deserti* (de Groot *et al.*, 2005, Toueille *et al.*, 2012). On retrouve également cette caractéristique chez des bactéries radiorésistantes comme *Rubrobacter radiotolerans* phylogénétiquement éloignée de *D. radiodurans* (Zimmerman & Battista, 2005) alors que chez une bactérie sensible comme *E. coli*, l'ADN est plus diffus dans la cellule (Figure 5). Par contre, la forme en anneau n'est pas conservée chez les bactéries radiorésistantes.

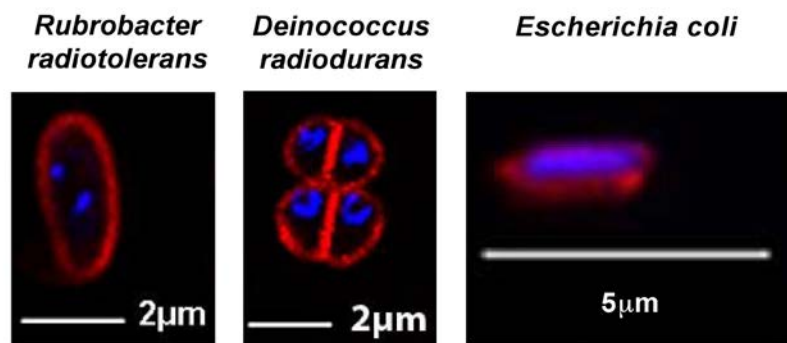


Figure 5 : Structure du nucléoïde de *Rubrobacter radiotolerans*, *D. radiodurans* et *E. coli*. D'après (Zimmerman & Battista, 2005).

L'ADN est coloré au DAPI (coloration bleue) et les membranes au FM-4-64 (coloration rouge).

Cette structure compacte est maintenue après exposition à une dose de 5 kGy de rayonnement γ (Zimmerman & Battista, 2005) ainsi que chez un mutant *recA30* incapable de réparer son génome après irradiation. Il a été proposé que cette organisation du nucléoïde permette d'éviter une dispersion des fragments d'ADN et de faciliter ainsi la réparation des cassures double brin de l'ADN (Zimmerman & Battista, 2005).

Il a été montré que la protéine HU joue un rôle majeur dans la structuration du nucléoïde et est avec l'ADN gyrase, la protéine la plus abondante au niveau du nucléoïde (Toueille *et al.*, 2012). La protéine HU est essentielle à la survie de la cellule et il est impossible de construire une souche mutante Δhns homozygote (Nguyen *et al.*, 2009). Toutes les copies chromosomiques du gène *hns* peuvent par contre être délétées si le gène *hns* est exprimé en *trans* à partir d'un vecteur d'expression thermosensible pour sa répllication. A température permissive, les cellules sont viables. Par contre, la déplétion de la protéine HU à température non permissive entraîne dans un premier temps une décompaction du nucléoïde suivie d'une fragmentation du nucleoïde puis de la lyse des cellules (Nguyen *et al.*, 2009). L'intégrité du nucléoïde joue un rôle majeur dans la viabilité cellulaire en absence ou en présence de stress.

B. Une protection des protéines contre l'oxydation

De nombreux agents génotoxiques n'agissent pas directement sur l'ADN, leur effet génotoxique provient du fait qu'ils augmentent la quantité de ROS intracellulaires et donc les dommages à l'ADN et cellulaires associés. Plusieurs mécanismes de protection contre ces ROS et le stress oxydatif sont présents chez les bactéries. Plusieurs niveaux de défense existent incluant des systèmes enzymatiques (impliquant une catalase, ou une superoxyde dismutase), non enzymatiques (caroténoïdes, taux de manganèse) ou de nettoyage de la cellule (protéases).

Des systèmes enzymatiques permettent de convertir directement les ROS en molécules neutres ou moins réactives. Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène et les catalases convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (Figure 6). *D. radiodurans* possède 4 SOD (Mn-dépendante DR1279, et Cu/Zn-dépendantes DR1546, DRA0202 et DR0644) et 3 catalases (DR1998, DRA0259, DRA0146). Elles sont toutes induites après irradiation (Tanaka *et al.*, 2004) sauf DR1279 (Mn-SOD) exprimée de manière constitutive (Lipton *et al.*, 2002). Leur absence rend les souches sensibles à H_2O_2 (Markillie *et al.*, 1999). La catalase DR1998 et la MN-SOD DR1279 sont très proches des homologues retrouvés chez *E. coli* (Dennis *et al.*, 2006, Markillie *et al.*, 1999), cependant, chez *D. radiodurans*, l'activité catalase est plus élevée que chez *E. coli* (Wang & Schellhorn, 1995, Tian *et al.*, 2004).

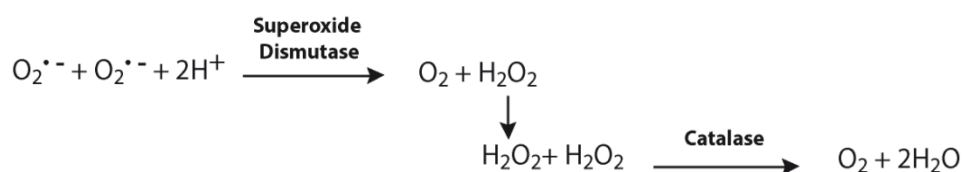


Figure 6 : Systèmes enzymatiques de traitement des espèces réactives de l'oxygène : réactions catalysées par les superoxyde dismutases et les catalases

D. radiodurans a une pigmentation rose due à la production de divers caroténoïdes. Le plus produit, la deinoxanthine, à un pouvoir antioxydant supérieur à celui des β -carotènes (Tian *et al.*, 2007, Ji, 2010) et est capable de piéger H_2O_2 et l'oxygène singulet 1O_2 , forme excitée de la molécule d' O_2 . Un mutant $\Delta crtB$ ou $\Delta crtI$, affecté dans des gènes impliqués dans la voie de production des β -carotènes, est plus sensible aux rayons γ , à la dessiccation et à H_2O_2 (Xu *et al.*, 2007). Cependant, des mutants non pigmentés ont déjà été retrouvés après exposition des cellules aux rayons γ et ils présentaient la même résistance aux radiations qu'une souche sauvage probablement parce que les autres mécanismes de protection contre le stress oxydatif compensent l'absence de pigments antioxydants.

Des travaux de Daly en 2004, 2006 et 2007 ont mis en évidence l'importance du manganèse Mn(II) pour la survie de *D. radiodurans* après irradiation. Le Mn(II) est capable de se complexer aux ROS et ainsi de les piéger (Figure 7A) (Xu *et al.*, 2007). Chez *D. radiodurans*, le ratio $[Mn^{2+}] / [Fe^{2+}]$ est très élevé (Daly *et al.*, 2004). On retrouve ce ratio élevé chez d'autres bactéries radio-résistantes (*D. geothermalis*) alors qu'il est beaucoup plus faible chez les bactéries radio-sensibles (*E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*) (Daly, 2006, Krisko & Radman, 2010). On retrouve de façon corrélée, une plus faible oxydation des protéines chez les espèces avec un ratio $[Mn^{2+}] / [Fe^{2+}]$ élevé ainsi qu'une meilleure résistance à l'irradiation (Figure 7B) (Daly *et al.*, 2007). Chez *D. radiodurans*, il a été montré que les ions Mn^{2+} étaient majoritairement retrouvés au niveau du nucléoïde tandis que les ions Fe^{2+} sont concentrés au niveau des septums de division (Daly *et al.*, 2007). En plus de limiter la concentration des ions Fe^{2+} , l'accumulation de ces ions dans un endroit bien précis de la cellule permet de limiter la production de ROS liée aux réactions de Fenton et d'éviter que ces ROS n'attaquent l'ADN ou les protéines dans l'ensemble de la cellule.

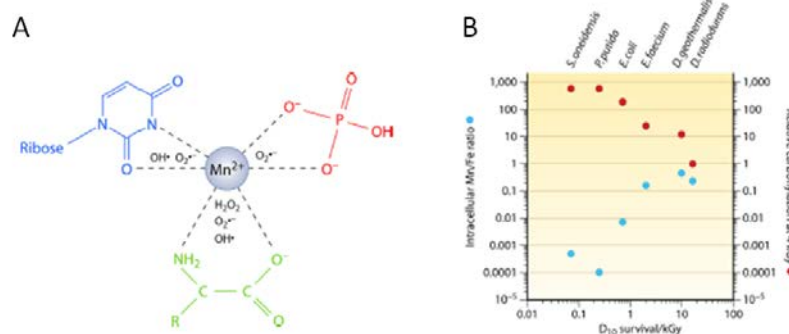


Figure 7 : Rôle du Manganèse dans les mécanismes de protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

(A) Complexes entre les ions Mn^{2+} et les bases (bleu), l'orthophosphate (rouge) et les acides aminés (vert) et leur activité de piégeage des ROS. (B) Relation entre le ratio $[Mn^{2+}]/[Fe^{2+}]$, la carbonylation des protéines et la capacité de survie au rayonnement gamma chez différentes espèces. (D'après (Slade & Radman, 2011))

Lorsqu'on filtre la phase aqueuse d'un homogénat de cellules de *D. radiodurans* de manière à éliminer les protéines et les plus gros peptides, on trouve dans le filtrat du manganèse, du phosphate, des acides aminés, des peptides et des bases. Le manganèse est principalement en complexe avec les autres molécules. Ce filtrat est capable d'améliorer la résistance de la bactérie *E. coli* et de cellules humaines à une exposition à des doses d'irradiation létales si le filtrat n'est pas ajouté. *In vitro*, lorsque l'enzyme BamHI dont l'activité est sensible aux ROS (Daly *et al.*, 2007) est exposée à une dose de 4 kGy d'irradiation en présence de ce filtrat, son activité est préservée (Daly *et al.*, 2010). Il est proposé que l'abondance de métabolites complexés au manganèse dans le cytosol permette de protéger les protéines du stress oxydatif provoqué par l'irradiation ou la dessiccation (Culotta & Daly, 2013).

Tous ces mécanismes agissant de concert dans l'élimination ou le piégeage des ROS permettent une protection efficace des protéines contre l'oxydation. De cette manière, elles restent fonctionnelles immédiatement après irradiation pour participer à la réparation de l'ADN, la réponse au stress, la synthèse protéique ce qui permet de faire face à des doses extrêmes d'agents génotoxiques sans perte de viabilité.

En plus de ces systèmes de protection des protéines, *D. radiodurans* code un grand nombre de protéases potentielles (Makarova *et al.*, 2001) et plusieurs d'entre elles ainsi que des protéines chaperonnes sont induites après irradiation (Tanaka *et al.*, 2004), permettant un nettoyage efficace des protéines oxydées. De même, un système d'export de l'ADN endommagé est mis en place, puisqu'on retrouve un grand nombre de fragments d'ADN portant des lésions dans le milieu extracellulaire après irradiation (Vukovic-Nagy *et al.*, 1974).

C. Une réponse au stress et des protéines originales

Afin de mettre en place tous ces mécanismes de défense, il est important qu'une réponse coordonnée et efficace soit activée. Les études transcriptomiques (Liu *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2004) et les annotations du génome (White *et al.*, 1999, Makarova *et al.*, 2007) ont mis en évidence un grand nombre de protéines spécifiques des *Deinococcaceae* induites après irradiation et de fonction inconnue. Elles ont été principalement regroupées sous le nom de Ddr-protéines pour « DNA damage response proteins » et la fonction d'un certain nombre d'entre elles a été élucidée depuis 2004 (voir plus loin).

Chez *E. coli*, lorsque des dommages de l'ADN sont présents, le clivage RecA-dépendant de la protéine LexA permet d'induire l'expression d'un certain nombre de gènes faisant partie de la réponse SOS

comme des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN dont *recA* (pour revue (Kreuzer, 2013, Baharoglu & Mazel, 2014)).

Chez *D. radiodurans*, le clivage de LexA1 ou LexA2, les deux homologues de LexA d'*E. coli*, est également dépendant de RecA. Cependant, l'induction du gène *recA* n'est pas contrôlée par LexA1 ni LexA2 après irradiation (Narumi *et al.*, 2001, Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002, Satoh *et al.*, 2006). En revanche, le gène *recA* fait partie du régulon RDR pour Radiation Dessiccation Response. Ce régulon regroupe plus d'une vingtaine de gènes avec les caractéristiques communes d'être induits après irradiation et d'avoir un motif régulateur RDRM (Radiation Dessiccation Response Motif) dans leur région promotrice. Parmi ces gènes, on trouve des gènes codant pour des protéines de maintien de l'intégrité du génome connues comme RecA, GyrA, SSB, UvrA, ... , de protection contre le stress oxydatif comme KatA et des gènes codant des protéines spécifiques des *Deinococaceae*, DdrA, DdrB, DdrC, DdrD, DdrO, PprA, ... Le motif RDRM (Figure 8) est palindromique et constitué de 17 pb avec un taux de conservation variable selon les bases (Makarova *et al.*, 2007). Cela suggère qu'un régulateur transcriptionnel puisse cibler cette séquence et être un régulateur global du régulon RDR.

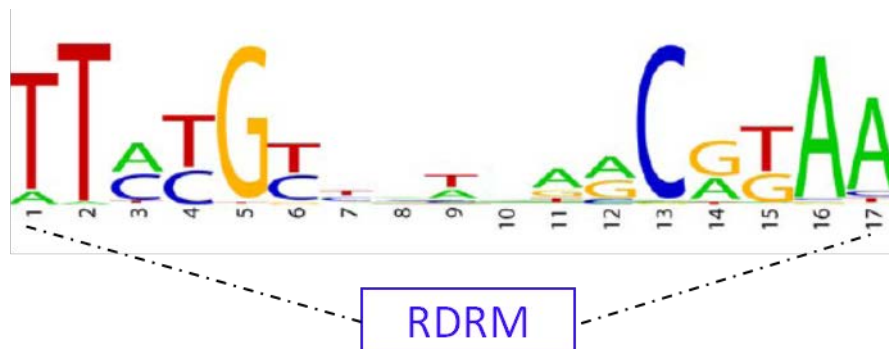


Figure 8 : Motif RDRM chez *D. radiodurans* (Makarova *et al.*, 2007)

Il a été montré que la protéine IrrE est requise pour l'expression de plusieurs gènes de ce régulon : *recA*, *ssb*, *pprA* (Earl *et al.*, 2002a, Hua *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2012, Lu *et al.*, 2009) et qu'elle est nécessaire à la résistance à l'irradiation et à la dessiccation (Earl *et al.*, 2002a, Hua *et al.*, 2003). Cependant, IrrE n'est pas capable de se fixer sur de l'ADN contenant le motif RDRM (Vujicic-Zagar *et al.*, 2009) et des études structurales et de mutagenèse dirigée ont montré qu'il s'agit d'une métalloprotéase Mn dépendante présentant une activité protéolytique qui serait nécessaire à la radiorésistance (Wang *et al.*, 2015, Vujicic-Zagar *et al.*, 2009). Récemment, un modèle de régulation du régulon RDR faisant intervenir IrrE et DdrO, un régulateur transcriptionnel putatif induit après

irradiation et faisant partie du régulon RDR, a été proposé (Ludanyi *et al.*, 2014 , Devigne *et al.*, 2015).

DdrO, exprimé à un taux basal dans la cellule, réprime le régulon RDR probablement en se fixant sur le motif RDRM (Wang *et al.*, 2015). Après irradiation, la quantité de protéine DdrO décroît de manière dépendante de IrrE (Ludanyi *et al.*, 2014 , Devigne *et al.*, 2015). En effet IrrE est capable après irradiation de cliver DdrO et de le rendre inactif ce qui lève la répression et permet l'expression des gènes du régulon RDR (Ludanyi *et al.*, 2014). La déplétion de DdrO entraîne une augmentation de l'expression des protéines PprA, GyrA et DdrB (Devigne *et al.*, 2015) ce qui est cohérent avec un rôle de répresseur du régulon RDR. Le gène *ddrO* fait partie du régulon RDR ce qui entraîne une boucle de rétrocontrôle de sa propre expression. Lorsque le clivage de DdrO cesse, sa concentration cellulaire augmente à nouveau et le régulon RDR est de nouveau réprimé. En revanche, si l'activation du régulateur IrrE perdure et/ou si le niveau de DdrO n'est pas retrouvé rapidement, comme il a été montré lors de déplétions de DdrO (Devigne *et al.*, 2015), la cellule s'engage dans une voie apoptotique. En effet, une déplétion de DdrO entraîne l'apparition de cellules fantômes, la formation de « bulles » dans les membranes ainsi qu'une fragmentation de l'ADN, des phénotypes caractéristiques d'une cellule en apoptose chez les bactéries (pour revue, voir (Bayles, 2014)). Il est proposé que des gènes pro-apoptotiques soient activés tardivement en absence prolongée de DdrO. Parmi ces gènes, on pourrait trouver un gène codant une nucléase qui dégraderait l'ADN. La balance entre la quantité d'IrrE actif et de DdrO non clivée est une étape déterminante dans le retour à l'état avant irradiation. Les signaux d'activation et d'inactivation d'IrrE ne sont pas connus. IrrE est exprimé de manière constitutive (Gao *et al.*, 2006) ce qui suggère que son activité protéase soit activée après irradiation afin de cliver DdrO et d'induire une réponse globale face à ce stress. Il est proposé que le taux de ROS dans le cytosol ou la présence de lésions de l'ADN soient des signaux permettant d'activer la protéase IrrE (Devigne *et al.*, 2015). A l'inverse, une diminution des ROS intracellulaires et la réparation des dommages de l'ADN après irradiation pourraient permettre une inactivation de l'activité protéase d'IrrE et la répression du régulon RDR par DdrO. Il est à noter que la protéine DdrO est essentielle à la viabilité de *D. radiodurans* et de *D. deserti* (Devigne *et al.*, 2015 , Ludanyi *et al.*, 2014) et qu'il est impossible d'inactiver toutes les copies de ce gène.

L'identification, par mutagenèse par transposition, de gènes impliqués dans la régulation de l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *ddrB*, un gène du régulon RDR, a permis de mettre en évidence un lien entre la voie de régulation de *ddrB* et le métabolisme cellulaire. Une grande partie des insertions cartographiées se trouvaient dans une des deux sous unités de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase (KGDH). Cette enzyme fait partie du cycle de Krebs et convertit l'alpha-cétoglutarate en succinyl-CoA et son activité est sensible au ROS (Tretter & Adam-Vizi, 2005).

Il a été proposé que la sous-unité E2 de KGDH soit un senseur du taux d'oxydation de la cellule (Mailloux *et al.*, 2007, Mailloux *et al.*, 2009). La présence de ROS diminuerait son activité ce qui provoquerait une accumulation de l'alpha-cétoglutarate, une molécule à l'activité antioxydante.

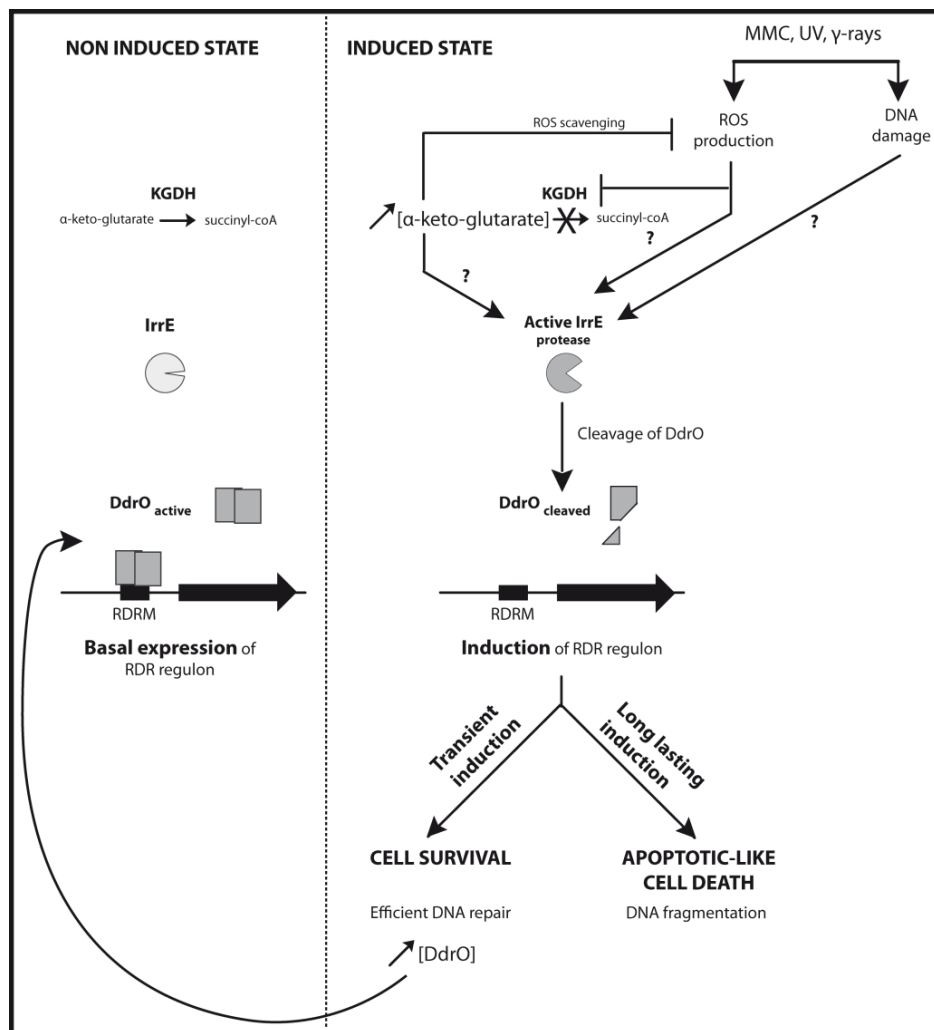


Figure 9 : Modèle de régulation du régulon RDR par DdrO et IrrE chez *D. radiodurans* (Devigne *et al.*, 2015).

Il existe un autre régulateur transcriptionnel spécifique des *Deinococcaceae* : DrRRA (Wang *et al.*, 2008). L'absence de ce gène entraîne une forte sensibilisation des cellules au rayonnement UV, à H₂O₂, à la dessiccation et au rayonnement γ avec un taux de survie de seulement 1% à une dose de 2 kGy. Son absence induit la diminution de l'expression d'un grand nombre de gènes avec ou sans exposition aux rayons γ (Wang *et al.*, 2008). Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN comme *recA*, la sous unité de l'ADN gyrase *gyrB*, *pprA*, *uvrB*, des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif codant pour des superoxydes dismutases (DR1279 et DR1546) ou la catalase KatA (DR1998) et des gènes spécifiques des *Deinococcaceae* comme *ddrC* et *ddrI*. Il a été montré que DrRRA se fixe de manière spécifique au promoteur du gène *ddrI* mais le motif de fixation n'a pas été déterminé (Wang *et al.*, 2008). DdrI a été prédit comme étant un régulateur transcriptionnel mais les gènes qu'il régule ne sont pas connus à ce jour. DrRRA et DdrI pourraient faire partie d'une boucle de régulation impliquée dans la radiorésistance. On remarque également qu'il y a une superposition entre certains gènes appartenant au régulon RDR régulés par le système IrrE/DdrO et ceux régulés par DrRRA, comme *recA* et *pprA*, ce qui suggère une grande complexité des réseaux de régulation chez *D. radiodurans* et le lien entre ces différentes voies de régulation reste encore à élucider.

Chez *E. coli*, OxyR régule l'expression de plusieurs gènes, en particulier des gènes codant pour des catalases et des peroxidases impliquées dans le nettoyage des ROS cellulaires. Il est proposé qu'OxyR soit activé en présence de H₂O₂ via la réduction de résidus soufrés entraînant la formation d'un pont di-sulfure (pour revues : (Dubbs & Mongkolsuk, 2012, Imlay, 2008, Farr & Kogoma, 1991)). Deux homologues d'OxyR sont présents chez *D. radiodurans* et leur absence entraîne une forte sensibilisation à H₂O₂ et une accumulation des ROS. Plus de 130 gènes sont induits en leur absence et 150 gènes sont réprimés dont le gène codant la catalase DR1998 dans des conditions de croissance « normales » en absence d'exposition à des stress génotoxiques (Chen *et al.*, 2008).

D. Des mécanismes efficaces de réparation de l'ADN

Il a été montré que l'ADN de *D. radiodurans* n'est pas plus protégé des cassures de l'ADN engendrées par l'exposition au rayonnement γ que celui d'*E. coli* (Gerard *et al.*, 2001). La radio-résistance exceptionnelle de *D. radiodurans* est donc également liée à sa capacité à réparer efficacement son génome après irradiation. A une dose de 6 kGy, environ 200 cassures double brin, 3000 cassures simple brin et bien plus de dommages des bases sont engendrées mais *D. radiodurans* y résiste avec un taux de survie de 100% (Slade & Radman, 2011). On peut suivre la cinétique de réparation de l'ADN après irradiation en faisant migrer par électrophorèse en champ pulsé de l'ADN extrait de cellules irradiées et incubées différents temps après irradiation. L'ADN est préalablement digéré par l'enzyme NotI ce qui permet de comparer les profils de digestion avant et après irradiation. Immédiatement après irradiation, on observe une fragmentation du génome en morceaux d'une taille moyenne de 50 Kb si les cellules sont irradiées à une dose de 6800 Gy de rayonnement γ . On observe ensuite une diminution de la quantité d'ADN génomique présent dans les cellules, puis une reconstitution progressive du génome. Deux heures après irradiation, toutes les bandes correspondant au profil de restriction du génome par l'enzyme *Not1* sont reconstituées, puis la quantité d'ADN augmente indiquant la reprise de la réplication (Figure 10).

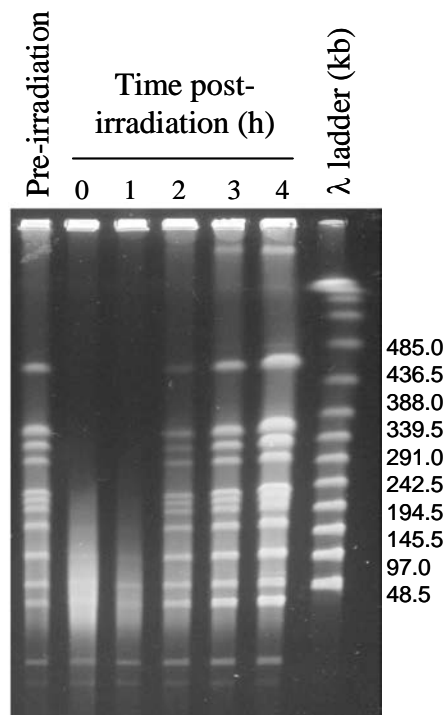


Figure 10: Cinétique de réparation des cassures de l'ADN après irradiation γ

Les cellules sont exposées à une dose de 6800 Gy de rayonnement γ puis remises en culture. Des échantillons sont prélevés à différents temps après irradiation, l'ADN extrait de ces souches est placé dans des cubes d'agarose et digéré par *Not1* est soumis à une électrophorèse en champ pulsé. Le premier puits correspond à de l'ADN extrait à partir de cellules non irradiées (D'après (Blasius *et al.*, 2008))

On observe dans les premières 90 minutes après irradiation une réduction de la quantité d'ADN cellulaire, cet ADN est en partie dégradé, des oligonucléotides qui portent des lésions sont exportés de la cellule (Vukovic-Nagy *et al.*, 1974) et les nucléotides endommagés sont dégradés par les hydrolases Nudix (Xu *et al.*, 2001).

Plusieurs mécanismes pourraient agir conjointement pour reconstruire un génome intact à partir de centaines de fragments, en particulier la recombinaison homologue (HR), le recollement des extrémités (NHEJ), proposé par Narumi et al. (Narumi *et al.*, 2004), mais jamais mis en évidence et l'appariement simple brin dépendant d'une synthèse massive d'ADN, l'ESDSA (Zahradka *et al.*, 2006, Slade *et al.*, 2009). D'autres mécanismes jouent un rôle majeur dans la restauration d'un génome intact comme la réparation des mésappariements, la réparation par excision de bases et la réparation par excision de nucléotides, tous ces mécanismes seront décrits dans les chapitres suivants.

III. Maintien de l'intégrité du génome chez *D. radiodurans*

D. radiodurans exprime plusieurs protéines impliquées dans différentes voies de réparation de l'ADN : excision des bases et des nucléotides endommagés, réparation des mésappariements ou réparation des cassures de l'ADN (Tableau 2) qui contribuent au maintien de l'intégrité de son génome.

Voie de réparation et enzymes	Locus
Réversion directe des dommages des nucléotides	
<i>O</i> ⁶ -Methylguanine DNA methyltransferase (Ogt)	DR0428
Xanthosine triphosphate pyrophosphatase (YggV)	DR0179
BER : Réparation par excision de bases	
3-Methyladenine DNA glycosylase (AlkA)	DR2074
	DR2584
Uracil-DNA glycosylases (Ung)	DR0689
	DR1751
Mug	DR0715
Endonuclease V (Nfi)	DR2162
8-Oxoguanine DNA glycosylase (MutY)	DR2285
Formamidopyrimidine and 8-oxoguanine DNA glycosylase (MutM)	DR0493
8-oxo-dGTPase (<i>D. radiodurans</i> code 22 autres protéines de type Nudix potentiellement impliquées dans la détoxification du pool de nucléotides)	DR0261
Endonuclease III (Nth)	DR0928
	DR2438
	DR0289
Exonuclease III (Xth)	DR0354
NER : Réparation par excision de nucléotides	
UvrA1	DR1771
UvrB	DR2275
UvrC	DR1354
UvsE	DR1819
Mfd	DR1532
DNA or RNA helicase of superfamily II (Rad25)	DRA0131
Recombinaison Homologue	
RecA	DR2340
RecF	DR1089
RecO	DR0819
RecR	DR0198
RecJ	DR1126
RecN	DR1477
RecQ	DR1289
RecD	DR1902
SbcC	DR1922
SbcD	DR1921
RuvA	DR1274
RuvB	DR0596
RuvC	DR0440
RecG	DR1916
RadA	DR1105
Rad54 DNA helicase	DR1259
DdrA	DR0423
PprA	DRA0346
SSA : Réparation par appariement de régions simple brin	
DdrB	DR0070
MMR : Réparation des mésappariements	
MutL	DR1696
MutS1	DR1039
Autres protéines impliquées dans plusieurs mécanismes	
DNA polymerase I (PolA)	DR1707
DNA polymerase III	
DnaE (alpha)	DR0507
DnaQ (epsilon)	DR0856
DnaN (beta)	DR0001
Tau/gamma	DR2410
DNA ligase (LigA)	DR2069
SSB	DR0099
UvrD	DR1775
DNA gyrase	
GyrA	DR1913
GyrB	DR0906

Tableau 2 : Protéines et gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN chez *D. radiodurans* (D'après (Slade & Radman, 2011)).

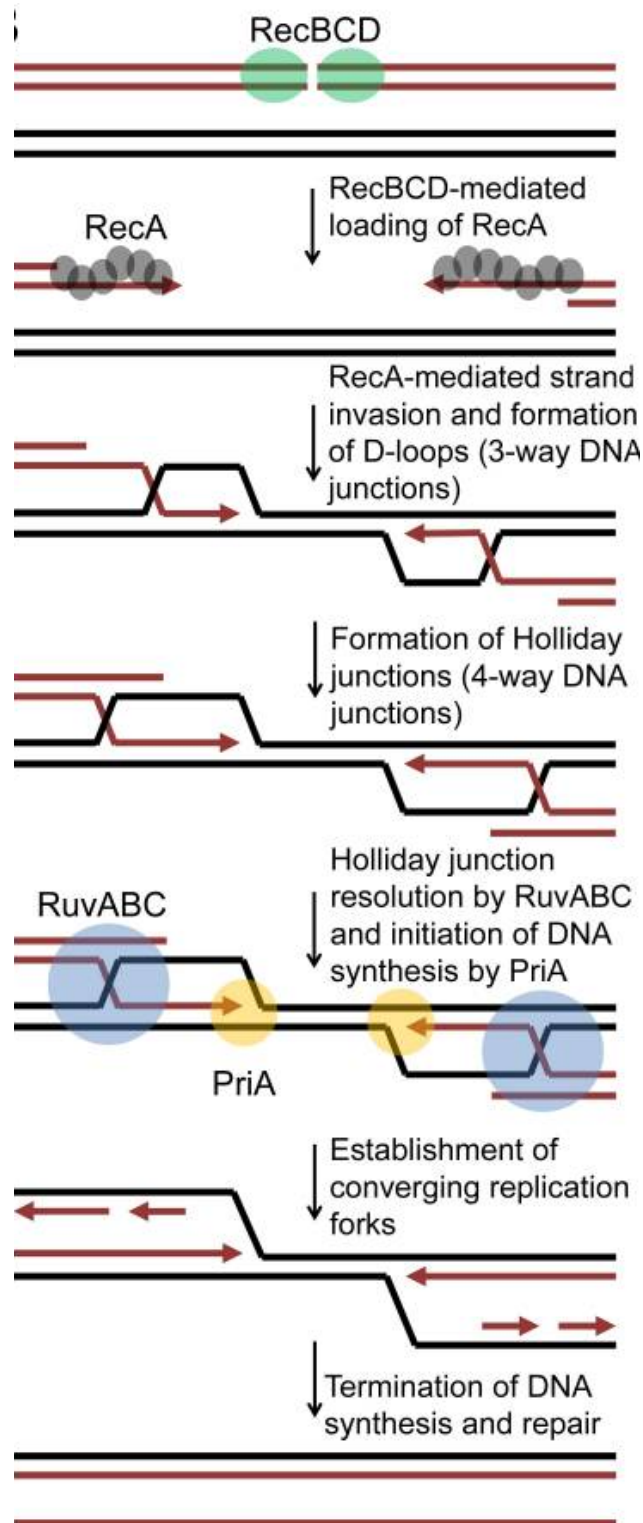


Figure 11: Les différentes étapes de la recombinaison homologue chez la bactérie *E. coli* (d'après (Mawer & Leach, 2014)).

1. Réparation des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans*

Les cassures double brin de l'ADN font partie des lésions les plus génotoxiques pour la cellule. Elles peuvent perturber le métabolisme de l'ADN en empêchant les machineries de réplication ou de transcription de progresser sur l'ADN matrice. Leur réparation est un enjeu majeur pour la viabilité des cellules, plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réparation de ces lésions.

A. Mécanismes RecA-dépendants

a) La recombinaison homologue

La recombinaison homologue permet la réparation des cassures de l'ADN impliquant un échange de brin entre la molécule d'ADN cassée et son homologue intacte. Elle fait partie des mécanismes de réparation les plus fidèles.

Chez la bactérie *E. coli*, ce mécanisme nécessite plusieurs étapes (Figure 11):

1. La reconnaissance de la lésion et la maturation des deux extrémités pour générer des extrémités simple brin sur lesquelles la protéine RecA sera chargée puis polymérisera de 5' vers 3' sur l'ADN simple brin
2. Une phase synaptique nécessitant la recherche et l'invasion par le nucléofilament RecA - ADN simple brin d'un ADN homologue entraînant la formation de D-loops et de jonctions de Holliday
3. Une phase d'initiation de la synthèse d'ADN de façon dépendante de la protéine PriA et la résolution des jonctions d'Holliday
4. L'établissement de 2 fourches de réplication convergentes et la terminaison de la réplication lorsque les 2 fourches ont convergé
5. Le comblement des brèches résiduelles et la refermeture de l'ADN pour restituer une molécule d'ADN intacte

La phase de reconnaissance de la cassure :

Chez *Bacillus subtilis*, la protéine RecN, appartenant à la famille des protéines SMC est une des premières protéines recrutées au nucléoïde après exposition à divers stress (irradiation, traitement à la mitomycine ou à l'acide nalidixique) ou lors de l'induction d'une seule cassure double brin de l'ADN par action d'une endonucléase spécifique. Initialement présente en faible quantité et de manière diffuse dans la cellule, on la retrouve concentrée au nucléoïde dans un focus unique une fois le stress appliqué (Kidane *et al.*, 2004, Kidane & Graumann, 2005). Il a été démontré grâce à

l'induction d'une unique cassure double brin cartographiée, que le focus RecN colocalise avec la cassure (Kidane & Graumann, 2005). On retrouve un seul focus RecN après exposition à des agents générant plusieurs cassures de l'ADN, il est proposé que RecN rassemble toutes les régions portant des cassures double brin de l'ADN dans un unique centre de réparation (Lenhart *et al.*, 2012, Ayora *et al.*, 2011). Il semblerait que la formation d'un seul focus de RecN soit dépendant de la dégradation de l'ADN et de la formation d'ADN 3' simple brin par une PPNase, AddAB ou RecJ (Alonso *et al.*, 2013, Sanchez *et al.*, 2006, Cardenas *et al.*, 2009, Cardenas *et al.*, 2011), un substrat pour lequel RecN a une affinité forte (Sanchez *et al.*, 2006). Chez *E. coli*, RecN est recrutée par RecA aux cassures de l'ADN et fait partie des gènes induits par le système SOS, et il semblerait que chez *E. coli*, RecN ne soit pas impliquée dans la reconnaissance initiale des cassures de l'ADN et ne soit pas recrutée avant la protéine RecA (Keyamura *et al.*, 2013).

Chez *D. radiodurans*, des mutants $\Delta recN$ ont une sensibilité accrue au rayonnement γ (environ 10 % de survie à 6 kGy), aux rayons UV ainsi qu'à la MMC (Funayama *et al.*, 1999). *In vitro*, contrairement à *BsRecN*, l'activité ATPasique de *DrRecN* est plus fortement stimulée par de l'ADNdb que de l'ADNsb (Reyes *et al.*, 2010). La fixation de l'ATP est nécessaire aux protéines de type SMC pour un changement de conformation de la protéine, pour sa dimérisation ou sa fixation sur l'ADN (pour revue (Strunnikov, 2006)). Grâce à la résolution de la structure 3D de *DrRecN* (Pellegrino *et al.*, 2012) et à l'observation qu'en présence de *DrRecN*, la ligature de molécules d'ADN par une ligase est stimulée (Reyes *et al.*, 2010), il a été proposé que *DrRecN* participe au maintien de la proximité des fragments d'ADN cassés en polymérisant sur l'ADNdb au niveau des cassures double brin de l'ADN (Pellegrino *et al.*, 2012).

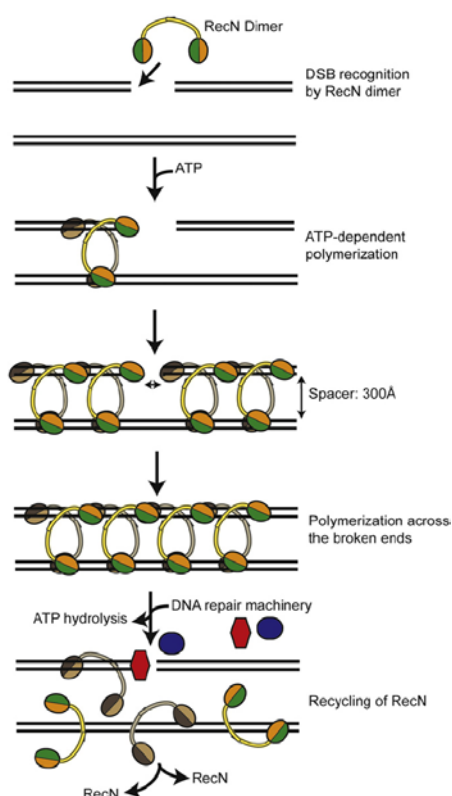


Figure 12: Modèle de reconnaissance des cassures double brin de l'ADN par RecN chez *D. radiodurans* (Pellegrino *et al.*, 2012)

La phase d'initiation de la recombinaison :

La maturation des extrémités 3' simple brin nécessite la dégradation asymétrique des extrémités double brin avec une dégradation plus importante de l'extrémité 5' générant ainsi une région 3' simple brin débordante. Il existe plusieurs complexes protéiques pouvant intervenir dans la maturation des extrémités 3' simple brin. Chez *E. coli*, il existe deux voies, la voie RecBCD (majoritaire) et la voie RecFOR.

Beaucoup d'études sur la mécanistique du complexe RecBCD ont été faites depuis la découverte de cette voie (pour revues : (Wigley, 2013);(Yeeles & Dillingham, 2010); (Dillingham & Kowalczykowski, 2008); (Roman *et al.*, 1991), (Hobbs *et al.*, 2007)).

Le complexe RecBCD se fixe au niveau des extrémités franches des cassures double brin et procède à l'ouverture de la molécule d'ADN, grâce aux activités hélicases de polarités opposées portées par RecB (3'→5') et RecD (5'→3'), et à la dégradation simultanée des deux brins d'ADN par l'activité nucléase du domaine C-terminal de RecB. Le complexe RecBCD progresse très rapidement sur l'ADN et son mécanisme d'ouverture des deux brins d'ADN est le plus rapide et le plus processif connu à ce jour. Sa progression est facilitée par les deux domaines tunnels de RecC, un domaine tunnel pour l'extrémité 5' et un domaine tunnel pour l'extrémité 3' facilitant la translocation des deux brins dans chacune des hélicases. N'ayant pas observé d'interaction entre RecB et RecD, des études structurales du complexe RecBCD suggèrent que RecC permette la cohésion du complexe en interagissant avec RecB d'une part et RecD d'autre part (Figure 13).

Lorsque le complexe rencontre le site Chi (χ), séquence spécifique de 8 nucléotides 5'GCTGGTGG 3', reconnue par le tunnel 3' de RecC, le complexe s'arrête. Il repart ensuite à une vitesse bien inférieure suite à la diminution de la vitesse de RecD. L'activité exonucléase 3'→5' de RecB est atténuée au profit de son activité exonucléase 5'→3', ce qui permet la formation d'une extrémité 3' simple brin. Bien que le complexe RecBCD ait repris sa progression, le site Chi reste piégé momentanément par RecC ce qui génère une boucle d'ADNsb entre RecB et RecC sur laquelle sera chargée RecA grâce à une interaction physique entre RecA et le domaine C-terminal de RecB. Il est proposé que le domaine C-terminal de RecB soit libéré par un changement conformationnel de RecC au moment de la reconnaissance du site Chi. Différents résultats suggèrent que l'activité de chargement de RecA est inhibée par RecD et que la reconnaissance du site χ par RecC lève cette inhibition (Figures 13 et 14).

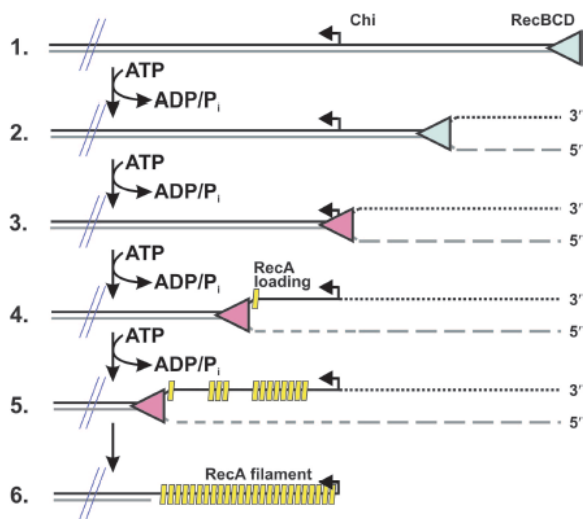


Figure 13 : Maturation des extrémités 3' simple brin par le complexe RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008).

1 et 2 : Fixation de RecBCD sur l'extrémité double brin, ouverture de l'ADN par les activités hélicases de RecD et RecB couplées à une hydrolyse de l'ATP. Dégradation des deux brins par RecB.

3 : pause du complexe RecBCD au site Chi reconnu par RecC, son activité est modifiée (rose), la vitesse de progression du complexe est ralentie et l'activité exonucléase 3'→5' atténuée tandis que l'activité 5'→3' est augmentée.

4 et 5 : nucléation de RecA sur l'ADN simple brin
6 : dissociation de RecBCD, le nucléofilament de RecA peut initier l'envahissement d'une molécule homologue

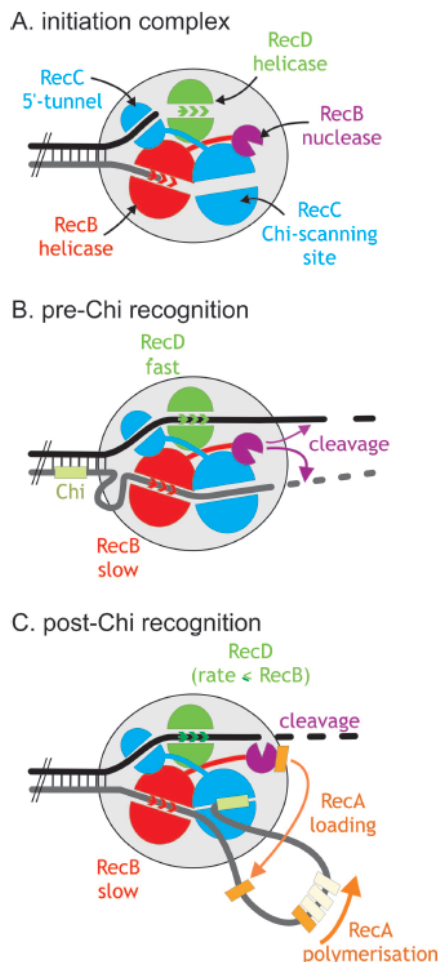


Figure 14 : Modèle structural de mécanisme d'action du complexe RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008).

A. Complexe RecBCD lors de l'initiation. Les deux tunnels de RecC facilitent la translocation de l'ADN dans les hélicases RecD et RecB. Le domaine C terminal de RecB possédant l'activité nucléase est positionné de manière à dégrader simultanément les deux brins.

B. Le complexe RecBCD progresse le long de l'ADN, l'activité hélicase de RecD étant plus rapide que celle de RecB, une boucle peut se former en aval de RecB. Le domaine C-terminal de RecB dégrade simultanément les deux brins.

C. Une fois que le complexe a rencontré le site Chi reconnu par le tunnel 3' de RecC, la vitesse de RecD diminue jusqu'à être inférieure à celle de RecB. L'activité exonucléase 3'→5' de RecB est atténuée tandis que l'activité 5'→3' est augmentée.

RecC reste fixée au site Chi ce qui entraîne la formation d'une boucle sur laquelle RecA sera chargée grâce au domaine C-terminal de RecB devenu mobile du fait du changement conformationnel de RecC.

Chez *D. radiodurans*, il n'y a pas d'homologue de cette voie car seul RecD est présente. Chez *B. subtilis*, il existe une voie similaire à RecBCD impliquant le complexe AddAB (Wigley, 2013); (Lenhart *et al.*, 2012); (Ayora *et al.*, 2011), (Ayora *et al.*, 2011), mais *D. radiodurans* ne possède pas non plus d'homologue des protéines AddA et AddB.

En revanche les homologues des protéines impliquées dans la voie RecFOR : RecQ, RecJ, RecF, RecO, RecR sont présentes chez *D. radiodurans*. Il est intéressant de noter qu'une étude bio-informatique a montré que la voie la plus conservée dans le monde bactérien est la voie RecFOR. Sur 117 génomes comparés, 77 ne possèdent ni RecB ni RecC, 30 ne possèdent que RecD alors que 9 seulement ne possèdent aucune protéine RecF, RecO ou RecR (Ayora *et al.*, 2011).

La voie RecFOR a été mise en évidence chez *E. coli* dans des souches déficientes pour la voie RecBCD, pour SbcB, une exonucléase 3'→5' et pour le complexe SbcCD ayant une activité exonucléase double brin. Il est proposé que la recombinaison soit restauré dans ce contexte par la voie RecFOR du fait de l'absence de dégradation des extrémités 3' simple brin par ces exonucléases (Ayora *et al.*, 2011), (Ryder *et al.*, 1996).

Chez *E. coli*, en absence de RecBCD, la première étape de formation des extrémités 3' simple brin implique l'hélicase 3'→5' RecQ permettant l'ouverture de l'ADN et l'exonucléase 5'→3' RecJ pour la dégradation de l'extrémité 5'. *In vitro*, 3 types d'extrémités générées par des cassures de l'ADN peuvent être prises en charge par ce complexe : des extrémités franches, 5' ou 3' simple brin sortantes (Figure 15). RecQ se fixe préférentiellement sur des extrémités 3' simple brin sortantes (Figure 15A), tandis que des substrats 5' simple brin sortants seront préférentiellement reconnus par RecJ. Dans ce dernier cas, RecJ pourra dégrader l'extrémité 5' sur 100 à 200 nucléotides sans l'intervention de RecQ (Figure 15C). L'ADN simple brin formé est protégé par SSB et il a été montré *in vitro* que l'interaction entre RecJ et SSB était nécessaire à la formation efficace des extrémités 3' simple brin (Morimatsu & Kowalczykowski, 2014).

Chez *D. radiodurans*, la protéine RecJ est essentielle à la viabilité des cellules et constitue la seule protéine avec une activité exonucléase 5'→3' présente dans la cellule (Bentchikou *et al.*, 2010). L'étude de la réparation de l'ADN après irradiation montre qu'un mutant $\Delta recQ$ n'a pas de sensibilité accrue aux rayons γ et ne présente pas de retard de réparation ni de problème de synthèse d'ADN lors de la réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA (voir plus loin). En revanche, un mutant $\Delta uvrD$ est sensible aux rayons γ , la réparation de l'ADN est retardée et la synthèse d'ADN au cours de la reconstitution du génome par ESDSA est ralentie et diminuée en comparaison de celle qui est mesurée dans une souche sauvage (Bentchikou *et al.*, 2010). Un double mutant $\Delta recQ\Delta uvrD$ a le même phénotype qu'un simple mutant $\Delta uvrD$ (Bentchikou *et al.*, 2010). Il est donc proposé qu'UvrD

participe à la réparation des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans*. Elle pourrait être impliquée dans l'étape « précoce » de maturation des extrémités et pourrait remplacer RecQ dans cette étape de la voie RecFOR.

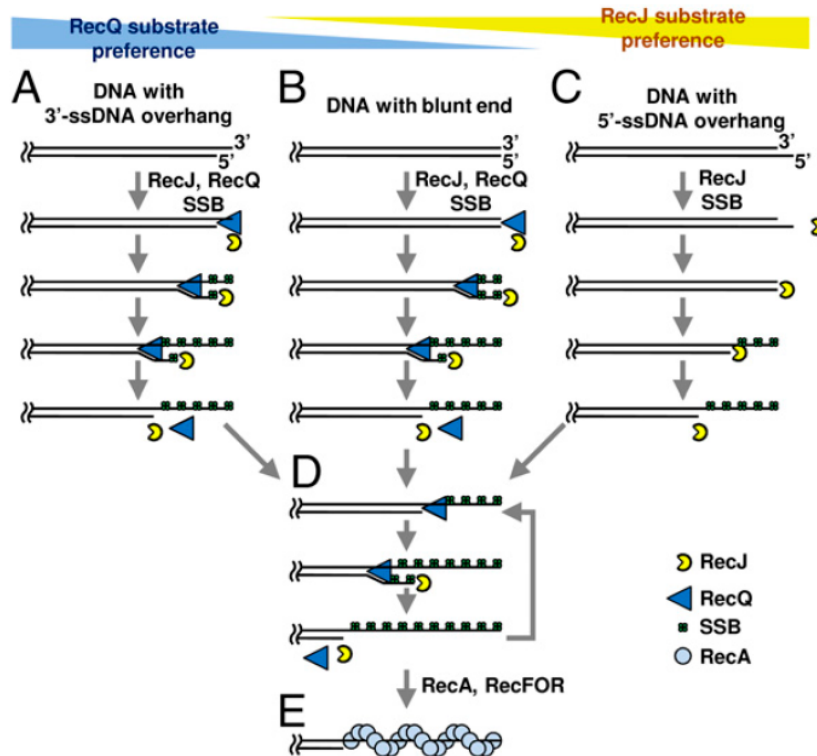


Figure 15 : Formation des extrémités 3' simple brin par RecQ et RecJ dans la voie RecFOR de réparation des cassures de l'ADN (Morimatsu & Kowalczykowski, 2014)

(A) Les extrémités 3'ADNsb sont prises en charge préférentiellement par RecQ puis RecJ dégrade l'extrémité 5'. (B) Prise en charge des extrémités franches par RecQ et RecJ. (C) les extrémités 5' ADNsb peuvent être dégradées par RecJ sur 100 à 200 nucléotides sans avoir besoin de RecQ. (D) Dans les trois situations A-C, une extrémité 3'ADNsb est formée permettant le recrutement du complexe RecFOR au niveau de la jonction ADNdb-ADNsb. RecOR facilite la nucléation de RecA en chassant SSB.

Le complexe RecFOR reconnaît ensuite la jonction entre l'ADNdb et l'ADNsb et facilite la nucléation de RecA sur l'ADNsb en présence de SSB (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003). RecO et RecR forment avec RecF deux complexes distincts, RecOR et RecFR (Bork *et al.*, 2001). La protéine RecO a la capacité de se fixer sur de l'ADNsb nu ou recouvert de SSB (Luisi-DeLuca & Kolodner, 1994, Umezu *et al.*, 1993, Umezu & Kolodner, 1994). Le complexe RecOR favorise la dissociation de SSB de l'ADNsb et son remplacement par RecA (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003, Umezu *et al.*, 1993, Umezu & Kolodner, 1994) (Figure 16). Une interaction physique entre RecO et SSB semble être nécessaire dans cette étape (Hobbs *et al.*, 2007). RecOR participerait également au maintien du nucléofilament RecA en évitant sa dissociation en 5' et stimulerait la réassociation de RecA (Shan *et*

al., 1997, Bork *et al.*, 2001). La protéine RecF se fixe préférentiellement sur des jonctions ADNdb-ADNsb et en association avec RecR inhibe la fixation de RecA sur l'ADNdb (Webb *et al.*, 1997, Morimatsu & Kowalczykowski, 2003). La surexpression de RecOR supprime partiellement le phénotype de déficience pour la recombinaison d'un mutant $\Delta recF$ (Sandler & Clark, 1994)). RecOR serait donc le complexe nécessaire au chargement de RecA tandis que RecF permettrait la bonne localisation de RecA au niveau des substrats d'ADNsb (Persky & Lovett, 2008). Toute la voie RecFOR a été reconstituée totalement *in vitro* (Handa *et al.*, 2009).

Il a également été montré que les protéines RecF, RecO et RecR sont impliquées dans la réparation de discontinuités simple brin de l'ADN chez *E. coli* (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003). L'hélicase RecQ et l'exonucléase RecJ seraient nécessaires pour l'élargissement de la région simple brin permettant la fixation de RecFOR (Lovett & Clark, 1984).

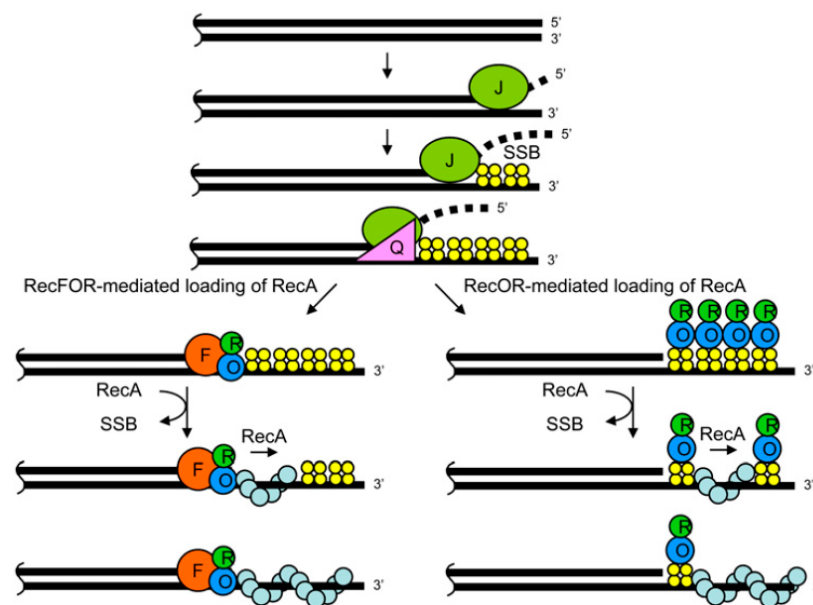


Figure 16 : Modèle de recrutement de RecA par RecFOR chez *E. coli* (Handa *et al.*, 2009).

L'extrémité 3' simple brin est générée par les activités hélicase de RecQ et exonucléase de RecJ. SSB protège l'ADN simple brin formé.

Recrutement de RecA par RecFOR (gauche) ou par RecOR seulement (droite).

La phase de synapse :

La formation du nucléofilament RecA nécessite deux étapes : la nucléation d'au moins 4 à 5 monomères (Galletto *et al.*, 2006) puis l'extension du nucléofilament dans le sens 5' → 3' sur l'ADNsb (Register & Griffith, 1985). Des études *in vitro* sur des molécules uniques montrent une extension du filament dans les deux directions (Galletto *et al.*, 2006). La nucléation est ATP-dépendante (Menetski & Kowalczykowski, 1985, Galletto *et al.*, 2006) et l'hydrolyse de l'ATP est responsable de la dissociation de monomères RecA du filament nucléoprotéique, préférentiellement depuis l'extrémité 5' du nucléofilament (Lindsley & Cox, 1990). Chaque monomère de RecA recouvre trois nucléotides ou paires de bases. La nucléation et la polymérisation de RecA sur l'ADN modifie la conformation de l'ADN qui est 50 à 60% plus étendu qu'en absence de RecA, ce qui pourrait faciliter la recherche d'homologie (Cox *et al.*, 2006, Nishinaka *et al.*, 1997, Klapstein *et al.*, 2004).

Ensuite, le nucléofilament RecA-ADNsb envahit une molécule d'ADNdb homologue et l'échange de brins est médié par la protéine RecA. On parle d'ADN hétéroduplex et de phase de synapse. La manière dont la recherche d'homologie est effectuée et dont l'ADN hétéroduplex est formé laisse encore beaucoup de questions en suspens. Des études récentes basées sur des techniques de biophysique ou de microscopie à fluorescence sur molécules uniques ou sur cellules vivantes ont permis de mettre en avant de nouvelles hypothèses encore débattues :

- Après induction d'une cassure double brin à un locus défini, RecA serait recrutée puis formerait un faisceau traversant toute la cellule à la recherche du locus homologue qui peut être situé très loin dans la cellule pour la réparation de la cassure avant de rassembler les deux locus à un seul endroit de la cellule (Lesterlin *et al.*, 2014).
- RecA glisserait le long de l'ADNdb et le scannerait pour rechercher de l'homologie (Ragunathan *et al.*, 2012), modèle qui avait été testé et non confirmé en 1998 par K. Adzuma (Adzuma, 1998).
- La protéine RecA testerait plusieurs appariements au niveau des régions d'ADNdb spatialement avoisinantes jusqu'à ce que l'appariement soit suffisamment stable pour former l'hétéroduplex (Forget & Kowalczykowski, 2012).

Chez *E. coli*, la formation des deux D-loops engendre des structures 3 brins (voir Figure 11) qui seront reconnues par la protéine PriA qui va permettre de charger le réplisome et d'initier la synthèse d'ADN. Les jonctions de Holliday seront prises en charge par le complexe RuvABC (voir paragraphe suivant) et leur résolution va engendrer deux fourches de réplication convergentes (voir Figure 11) qui vont se rencontrer entraînant la terminaison de la réplication suivie de la refermeture de l'ADN par une ligase.

La phase de migration et de résolution des jonctions de Holliday :

Une fois l'ADN homologue envahi et l'hétéroduplex établi, l'étape suivante est l'extension de la région d'ADN hétéroduplex par la migration des jonctions de Holliday. Le mécanisme de migration des jonctions est catalysé par les protéines RuvA et RuvB (Iwasaki *et al.*, 1992, Parsons *et al.*, 1992). La protéine RuvA se lie avec une grande affinité aux jonctions de Holliday (Iwasaki *et al.*, 1992, Parsons *et al.*, 1992), la fixation de RuvA sur l'ADN permet le recrutement de RuvB, formant un anneau hexamérique autour de l'ADN double brin (Figure 17) (Stasiak *et al.*, 1994).

In vitro, le complexe RuvAB présente une activité hélicase 5'→3' portée par RuvB, son interaction avec RuvA stimule son activité ATPasique (Mitchell & West, 1994, Mitchell & West, 1996, Parsons & West, 1993) nécessaire au processus de migration des jonctions. Il a été montré que la protéine RecG peut également se fixer sur les jonctions de Holliday et catalyser la réaction de migration des jonctions dans la direction (3'-5') opposée à celle catalysée par RuvAB (Lloyd & Buckman, 1991). Les mutants *rec⁻* et *ruvA⁻ruvB⁻* sont légèrement déficients pour la recombinaison homologue, alors que le triple mutant est sévèrement déficient (Lloyd & Buckman, 1991) suggérant une fonction partiellement redondante de RecG et RuvAB. Dans un contexte mutant *recBC sbcB sbcC*, l'inactivation de *recG* a des effets plus drastiques sur la recombinaison soulignant l'importance de cette protéine dans certains contextes (Lloyd & Buckman, 1991).

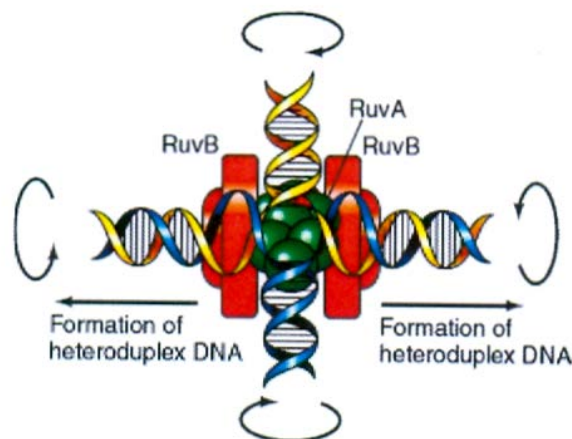


Figure 17 : Extension de l'ADN hétéroduplex par le complexe RuvAB.

Un tétramère de RuvA reconnaît la jonction de Holliday et permet le chargement de deux hexamères de RuvB. Les deux anneaux RuvB encerclent l'ADN double brin, transloquent sur cet ADN dans deux directions opposées et tirent l'ADN double brin à travers le tétramère RuvA ; l'ADN y est dénaturé, chaque brin issu d'un duplex s'apparie avec le brin complémentaire issu de l'autre duplex via RuvB. RuvAB catalyse ainsi la migration des jonctions de Holliday.

L'étape finale du processus de recombinaison homologue est la résolution des jonctions de Holliday (Holliday, 1964) (Figure 18). Le complexe RuvAB positionne la protéine RuvC sur les jonctions (Whitby *et al.*, 1996), cette protéine prend en charge le clivage spécifique des jonctions de manière symétrique (Connolly *et al.*, 1991). RuvC reconnaît une séquence spécifique de type 5'-A/T- TT[↓]-G/C-3' (Shah *et al.*, 1997). Le clivage peut produire des molécules recombinées de deux types : « spliced » issues d'une résolution induisant un échange réciproque entre les molécules parentales (*crossing-over*) et « patched », situation dans laquelle les molécules recombinées ont les régions flanquantes en association parentale (Figure 18B).

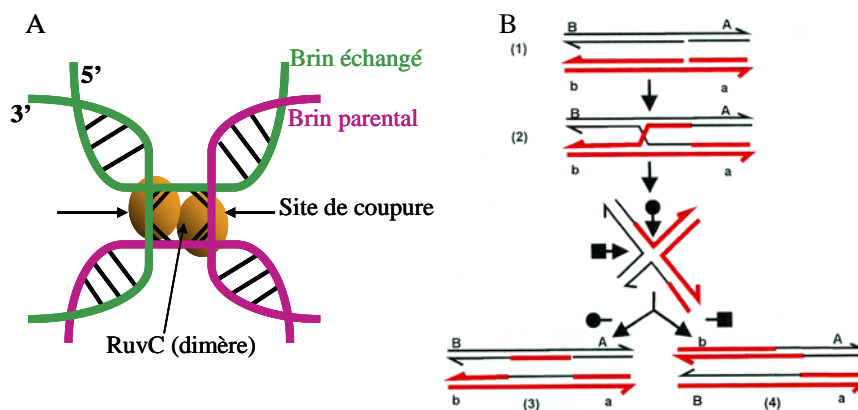


Figure 18 : Résolution des jonctions de Holliday par RuvC

(A) Clivage spécifique des jonctions de Holliday par la protéine RuvC d'après (West, 1996). (B) Représentation schématique de la résolution d'une jonction de Holliday. La résolution des jonctions peut donner naissance à deux types de molécules recombinées : (3) représente la molécule « patched » et (4) représente la molécule « spliced ».

D. radiodurans possède des homologues des protéines de la voie RecFOR pour la maturation des extrémités et le chargement de RecA sur l'ADN simple brin ainsi que les protéines RuvABC pour la migration des jonctions de Holliday et leur résolution. L'existence de la recombinaison homologue comme voie de réparation de l'ADN chez *D. radiodurans* a été mise en évidence pour la première fois par Daly et Minton au début des années 1990 en montrant l'induction *in vivo* de la recombinaison homologue entre des plasmides ou entre des copies homologues de chromosomes après exposition aux rayons γ (Daly *et al.*, 1994a, Daly *et al.*, 1994b, Daly & Minton, 1995).

Il existe d'autres mécanismes de réparation de cassures double brin impliquant une invasion par un ADNsb d'un ADNdb homologue et impliquant une synthèse d'ADN :

- La réplication induite par les cassures de l'ADN : BIR (Break induced replication) (Figure 19, panneau gauche) (pour revue (Anand *et al.*, 2013)).

Suite à l'introduction de cassures double brin dans l'ADN, la maturation des extrémités cassées génère un ADN simple brin 3' débordant. Cet ADN envahit un ADN double brin homologue créant ainsi une D-loop. Cet ADN simple brin servira d'amorce pour initier la réplication sur un des deux brins de la D-loop (leading strand DNA synthesis). Suite à migration de la D-loop, une réplication discontinue (lagging strand DNA synthesis) sera initiée en prenant pour matrice l'ADN néosynthétisé et la réplication en se poursuivant va restituer une molécule d'ADN double brin intacte (voir Figure 19, panneau gauche) .

- La réparation des cassures double brin de l'ADN par SDSA (synthesis-dependant strand annealing) (Figure 19, panneau droit).

Comme dans le mécanisme BIR, le SDSA implique l'envahissement d'un ADN double brin par l'extrémité 3' d'un ADN simple brin homologue qui sert d'amorce pour initier la synthèse d'ADN. Le brin néosynthétisé est ensuite déplacé et peut s'apparier avec l'extrémité simple brin formé par maturation de l'autre extrémité. Il ne restera plus qu'à combler les discontinuités simple-brin pour rétablir la continuité entre les deux fragments d'ADN.

Il faut noter que contrairement au mécanisme de réparation des cassures de l'ADN par recombinaison homologue, SDSA et BIR sont initiés à partir d'une seule des deux extrémités de la cassure et ne conduit pas à la formation de 2 jonctions de Holliday. La réparation des cassures de l'ADN par SDSA s'accompagnera donc d'une conversion génique sans crossing over (pour revue (McMahill *et al.*, 2007)).

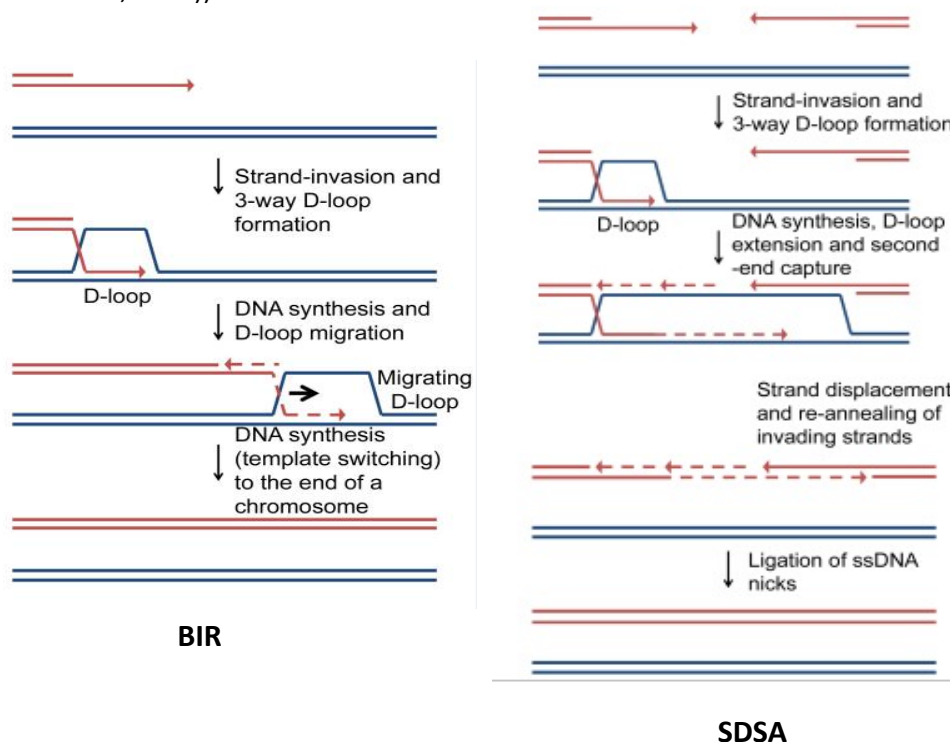


Figure 19: « Break-Induced Replication » (BIR) et réparation des cassures double brin de l'ADN par SDSA « Synthesis-Dependant Strand Annealing » (d'après (Mawer & Leach, 2014))

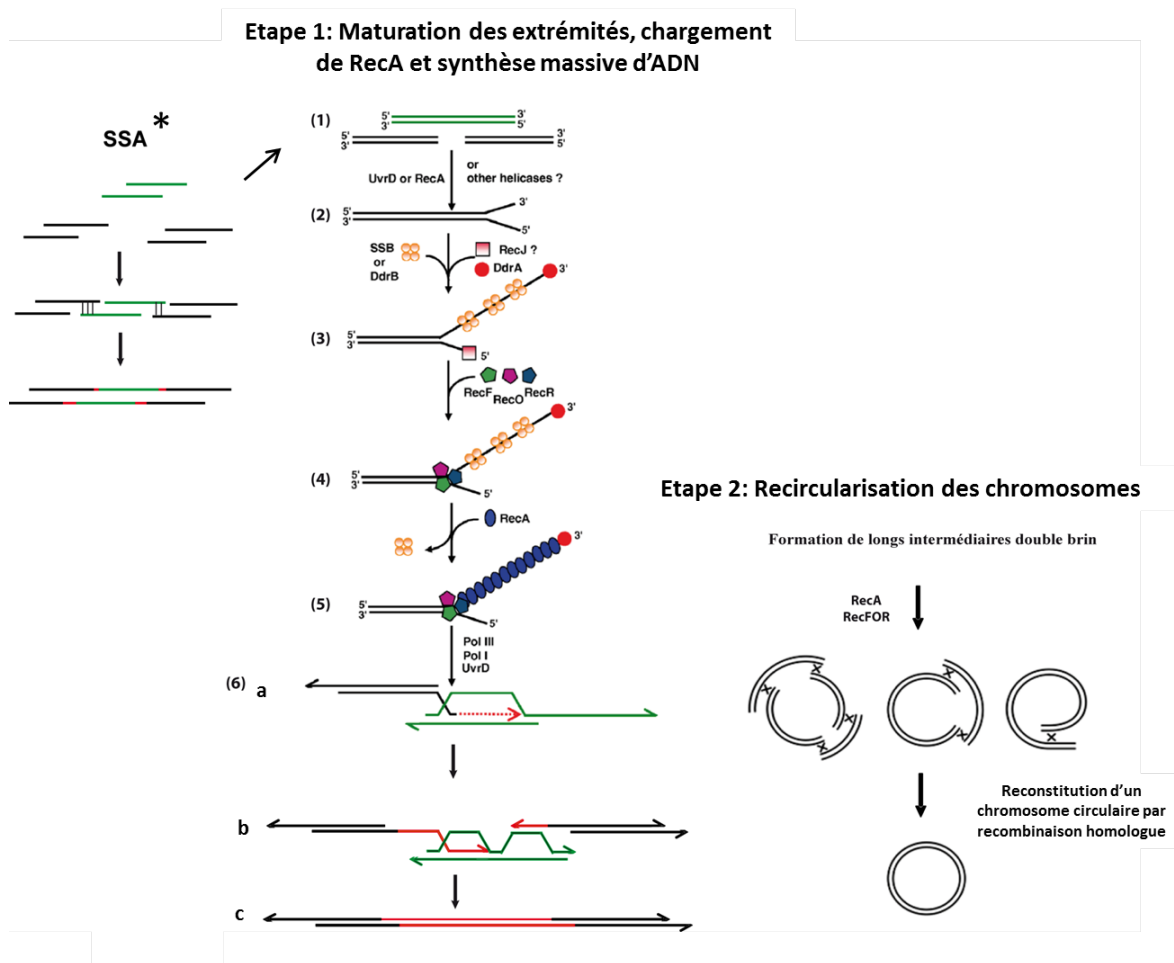


Figure 20: Etapes du mécanisme ESDSA chez *D.radiodurans*. (d'après (Zahradka *et al.*, 2006, Bentchikou *et al.*, 2010) ; (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011))

Etape 1 : maturation des extrémités, chargement de RecA, synthèse massive d'ADN et appariement des fragments d'ADN néosynthétisés

- (1) cassures double brin générées par l'irradiation en noir et vert, deux copies d'un chromosome.
- (2) et (3) Maturation des extrémités par UvrD, RecA et RecJ. Les extrémités simple brin peuvent être protégées par deux protéines de type SSB: SSB et DdrB et par la protéine DdrA qui protège les extrémités 3' simple brin de la dégradation par des exonucléases.
- (4) chargement de RecA par le complexe RecFOR sur les extrémités 3' simple brin.
- (5) invasion d'une molécule d'ADN homologue
- (6) (a) initiation de la synthèse d'ADN (en rouge) par Pol III et formation d'une D-loop dont la progression est probablement aidée par UvrD. (b) synthèse étendue d'ADN, (c) migration de la D-loop engendrant la lidération de longues extensions simple brin qui peuvent ensuite s'apparier entre elles. Les brèches peuvent être comblées par Pol I. Les longs fragments reconstitués contiennent des blocs d'ADN ancien et des blocs d'ADN néosynthétisé

Etape 2 : recircularisation des chromosomes par recombinaison homologue.

* réparation des petits fragments par SSA avant la mise en place du mécanisme ESDSA lorsque les cellules sont exposées à de fortes doses d'irradiation (proposé par Bouthier *et al.*, 2011 ; voir paragraphe II.B.a de cette thèse).

b) La réparation par synthèse massive d'ADN et appariement des brins d'ADN néosynthétisés : l'ESDSA (extended synthesis-dependent strand annealing)

Comme décrit dans le chapitre II, *D. radiodurans* est capable de survivre à des doses extrêmes de rayonnement γ . A une dose de 6,8 kGy, le génome est fragmenté en centaines de fragments et *D. radiodurans* reconstitue un génome intact à partir de ces morceaux en seulement 2 à 3 heures. La réparation des cassures double brin de l'ADN se déroule en deux étapes : (1) une phase de dégradation des fragments d'ADN générés par l'irradiation visualisée par la diminution de la quantité d'ADN observée sur gel et (2) une augmentation progressive de la taille des fragments correspondant à la reconstitution progressive puis totale du génome (Figure 10).

L'incubation des cellules après irradiation avec de la thymidine tritiée a permis de mettre en évidence un taux de synthèse d'ADN plus élevé que celui mesuré dans des cellules non traitées, et ceci pendant la période d'assemblage des fragments donc bien avant la reprise de la réplication après reconstitution du génome. La structure de l'ADN reconstitué a été suivie par incorporation de 5-bromodeoxyuridine (BrdU), un analogue lourd de la thymidine, dans des cellules irradiées et ces expériences ont montré que les chromosomes réparés sont des juxtapositions de fragments présents avant irradiation et de fragments synthétisés après irradiation. D'autres expériences de détection par immunofluorescence du BrdU incorporé dans l'ADN associées à des tests de photosensitivité de l'ADN dans des cellules traitées au BrdU après irradiation montrent la présence transitoire du BrdU dans de l'ADN simple brin rapidement converti en ADN double brin. Ces résultats ont conduit Miroslav Radman à proposer un modèle original de réparation de l'ADN après irradiation chez *D. radiodurans*, l'ESDSA (Zahradka *et al.*, 2006, Slade *et al.*, 2009, Bentchikou *et al.*, 2010). Ce mécanisme repose sur l'invasion par un ADNsb d'une molécule d'ADNdb homologue et sur la synthèse massive d'ADN observée pendant la phase de reconstitution du génome (Figure 20).

La maturation des cassures libère des extrémités 3' simple brin sur lesquelles la protéine RecA forme un nucléofilament puis initie l'invasion d'un brin complémentaire intact (Figure 20, étapes 1.1 à 1.5). Il est proposé que l'hélicase UvrD associée à l'exonucléase RecJ soient impliquées dans l'étape de maturation de l'ADN (Bentchikou *et al.*, 2010). Un délai de réparation et une diminution de la synthèse d'ADN dans un mutant $\Delta uvrD$ après irradiation permettent de proposer deux rôles de cette hélicase dans l'ESDSA, le premier dans la maturation des extrémités 3' (Figure 20, étape 1.2), le second dans la progression des fourches lors de la synthèse massive d'ADN (Figure 20, étape 1.6) (Bentchikou *et al.*, 2010). Il faut aussi noter que la synthèse d'ADN est ralentie dans des cellules $\Delta uvrD$ non exposées aux radiations suggérant un rôle de la protéine UvrD dans la réplication de l'ADN chez la bactérie *D. radiodurans* (Bentchikou *et al.*, 2010). La dégradation de l'ADN observé

rapidement après irradiation est étonnamment réduite dans un mutant $\Delta recA$. RecA pourrait donc également participer à la toute première étape de l'ESDSA en contrôlant et en limitant la dégradation de l'ADN à partir des extrémités (Slade *et al.*, 2009).

Des travaux récents du laboratoire (Bentchikou *et al.*, 2010) ont montré que les protéines RecFOR jouent un rôle majeur dans l'initiation de l'ESDSA, probablement en permettant le chargement de RecA sur l'ADN simple brin (Figure 20, étapes 1.4 et 1.5). En absence de RecA, RecF, RecO ou RecR, les souches sont très radiosensibles, la synthèse d'ADN est fortement diminuée et ralentie après irradiation et il n'y a pas de reconstitution du génome avant 24h quand les cellules sont exposées à une dose de 6,8 kGy de rayonnement γ . Cette reconstitution tardive RecA- et RecFOR-indépendante du génome ne permet pas la survie des cellules et il est proposé qu'elle résulte d'un mécanisme de type SSA (Figure 20, étape *) (Slade *et al.*, 2009, Bouthier de la Tour *et al.*, 2011), voir plus loin le paragraphe dédié à ce mécanisme). Il est également proposé que RecFOR, et RecA jouent un rôle majeur dans la re-circularisation finale des chromosomes par recombinaison homologue (Figure 20, étape 2) (Bentchikou *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré qu'en absence d'irradiation, les mutants $\Delta recA$, $\Delta recF$, $\Delta recO$ et $\Delta recR$ ont le même phénotype avec un temps de génération de 5h contre 1h20 pour une souche sauvage, une perte de viabilité (lethal sectoring) des cellules très importante avec moins de 10% de cellules dans une culture capables de former des colonies et une synthèse d'ADN fortement diminuée et ralentie suggérant un rôle majeur de la protéine RecA et des protéines de la voie RecFOR au niveau de la prise en charge de fourches de réplication lorsque ces dernières se bloquent (Bentchikou *et al.*, 2010).

La synthèse majeure d'ADN au cours du processus ESDSA est ensuite initiée via la formation d'une D-loop qui progresse ensuite à la manière de la machinerie de transcription le long de la molécule d'ADN qui sert de matrice (Figure 20, étape 1.6), libérant ainsi de longues extensions d'ADN simple brin. La synthèse d'ADN peut s'étendre jusqu'à la fin de la molécule d'ADN envahie d'où la notion d'une synthèse étendue (extended). Les extensions simple brin néo synthétisées peuvent s'apparier avec les extensions simple brin complémentaires, les fragments d'ADN s'allongent ainsi de proche en proche générant un patchwork de blocs d'ADN ancien et de blocs d'ADN néosynthétisé.

Deux polymérases sont impliquées dans le mécanisme ESDSA : Pol I et Pol III. L'inactivation de l'une ou l'autre de ces deux polymérases aboutit à une dégradation rapide de l'ADN et à la mort des cellules après irradiation. Des expériences indiquent que Pol III est impliquée dans l'initiation de la synthèse d'ADN alors que Pol I et Pol III seraient requises dans l'élongation de la synthèse d'ADN au cours de l'ESDSA (Slade *et al.*, 2009).

La dernière étape consiste en la re-circularisation par recombinaison homologue des chromosomes à partir de ces longs fragments reconstitués (Figure 20, étape 2).

B. Mécanismes RecA-indépendants de réparation des cassures double brin de l'ADN

a) Le SSA (Single Strand Annealing)

Le Single Strand Annealing (SSA) est un autre mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN. Il repose également sur la complémentarité des séquences simple brin libérées lors de la maturation des extrémités. En revanche, il ne nécessite pas d'invasion de brin comme la recombinaison homologue ou l'ESDSA et est par conséquent indépendant de la protéine RecA. Ce mécanisme peut être source de délétion d'une région d'ADN au niveau de séquences répétées si l'appariement s'établit entre deux copies différentes de la séquence répétée localisées sur une même molécule d'ADN (Figure 21, panneau droit) ou bien source de translocation si l'appariement se fait entre des copies « ectopiques » situées sur deux chromosomes distincts. Ce mécanisme peut aussi permettre une réparation fidèle des cassures double brin de l'ADN grâce à un appariement simple brin entre des régions identiques localisées sur deux chromosomes homologues dans des cellules polyploïdes (au moins diploïdes) (Figure 21, panneau gauche)

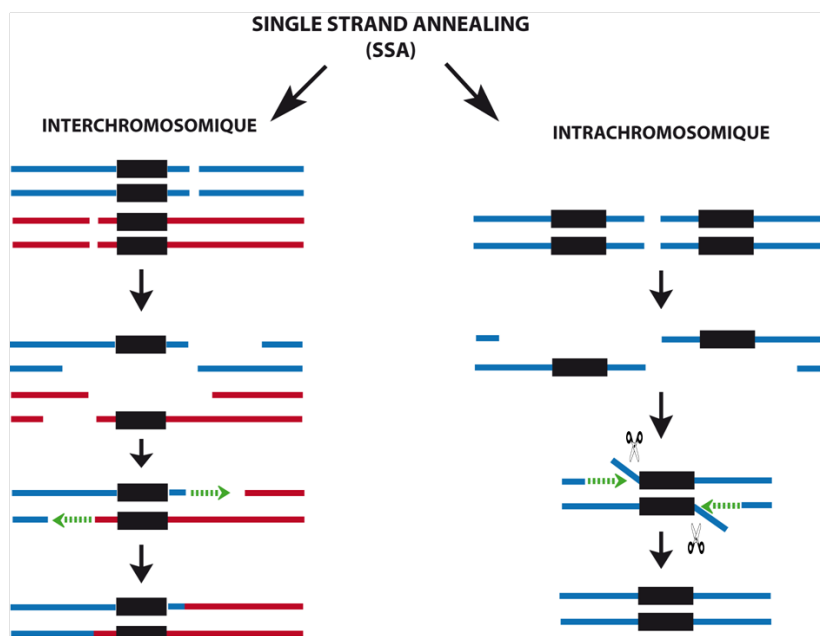


Figure 21 : Schématisation des événements de Single Strand Annealing (SSA) interchromosomiques et intrachromosomiques

Le mécanisme SSA a été principalement mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* lors de l'induction d'une cassure double brin localisée entre des régions répétées localisées sur une même molécule d'ADN (pour revues : (Mehta & Haber, 2014, Paques & Haber, 1999, Ivanov *et al.*, 1996)). La part non négligeable d'évènements Rad51-indépendants conduisant à la recombinaison entre les séquences répétées ont conduit les chercheurs à proposer un autre mécanisme d'appariement de régions simple brin complémentaires. Cet appariement est effectué par Rad52 aidée de son homologue Rad59. Des régions non appariées flottantes de part et d'autre des régions homologues appariées peuvent se former ce qui nécessite l'intervention d'endonucléases comme SAW1 et Rad1 pour leur clivage. Une fois les extrémités 3' ont clivées, la brèche restante est ensuite comblée par synthèse d'ADN et ligation (Figure 21, panneau droit).

L'existence du SSA chez *D. radiodurans* à été suggérée par deux observations :

1. Une partie des cassures double brin de l'ADN seraient réparées rapidement après irradiation dans un contexte $\Delta recA$ (Daly & Minton, 1996).
2. La reconstitution de fragments est observée 24h après irradiation dans des cellules $\Delta recA$ exposées à de fortes doses d'irradiation (Slade *et al.*, 2009, Devigne *et al.*, 2013).

Plusieurs protéines pourraient être impliquées dans un mécanisme de type SSA: RecO, DdrA et DdrB.

DrRecO pourrait comme chez *E. coli* catalyser l'alignement entre deux séquences simple brin complémentaires recouvertes de SSB (Kantake *et al.*, 2002) mais il a été montré qu'elle ne possède qu'une faible activité d'appariement simple brin comparée à celle de son homologue chez *E. coli* (Makharashvili *et al.*, 2004). De plus, la cinétique de reconstitution du génome après irradiation dans un mutant $\Delta recO$ n'est pas différente de celle observée dans un mutant $\Delta recA$ ce qui suggère que la protéine RecO n'est pas impliquée dans un mécanisme RecA-indépendant de réparation des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans* (Bentchikou *et al.*, 2010).

DdrA, une protéine spécifique des *Deinococcaceae* est un homologue fonctionnel de la protéine Rad52 (Harris *et al.*, 2004). Elle est induite après irradiation et est nécessaire à la survie des cellules exposées au rayonnement γ à des doses supérieures à 5 kGy (Tanaka *et al.*, 2004); (Jolivet *et al.*, 2006); (Harris *et al.*, 2004). Un mutant $\Delta ddrA$ est incapable de réparer son génome en absence de nutriments (Harris *et al.*, 2004). Les mutants $\Delta ddrA$ sont également sensibles à la mytomycine C (Selvam *et al.*, 2013). Il a été montré *in vitro* que DdrA se fixe sur les extrémités 3' simple brin et les protège de la dégradation par des exonucléases mais l'activité d'appariement d'ADN simple brin n'a pas pu être démontrée (Harris *et al.*, 2004). Un double mutant $\Delta recA \Delta ddrA$ est un peu plus sensible aux rayons γ qu'un simple mutant $\Delta recA$ ce qui suggérerait que l'implication de DdrA dans la protection

des extrémités simple brin pourrait également jouer un rôle dans un mécanisme indépendant de RecA nécessaire à la survie des cellules après irradiation (Harris *et al.*, 2004). En présence d'une quantité limitante de RecA et en absence de DdrA, *D. radiodurans* est plus sensible aux radiations qu'un simple mutant $\Delta ddrA$ tandis qu'une surexpression de RecA dans un mutant $\Delta ddrA$ restaure en partie la résistance aux radiations (Jolivet *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent qu'en présence d'une quantité limitante de RecA, le rôle de DdrA dans la protection des extrémités 3' simple brin pourrait être crucial pour permettre le recyclage des molécules de RecA et une réparation séquentielle des cassures de l'ADN. En présence d'une quantité élevée de RecA, les extrémités pourraient être protégées par une polymérisation de la protéine RecA sur l'ADN simple brin. On peut aussi proposer que la réparation rapide des cassures ne nécessite plus la protection des intermédiaires de recombinaison par DdrA (Jolivet *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la rôle fondamental de DdrA est la protection des extrémités 3' simple brin de la dégradation, propriété importante pour préserver les substrats nécessaires à la recombinaison homologue, à l'ESDSA mais aussi au SSA.

DdrB, une autre protéine induite après irradiation dont l'expression est régulée par IrrE/DdrO (Ludanyi *et al.*, 2014, Devigne *et al.*, 2015), représente une nouvelle famille de protéines de type SSB capable de se fixer sur l'ADN simple brin (Norais *et al.*, 2009, Xu *et al.*, 2010). Tout comme SSB chez *E. coli*, la fixation de DdrB sur de l'ADN simple brin inhibe la fixation de RecA (Norais *et al.*, 2009). De plus, contrairement à son homologue SSB, DdrB est capable d'apparier des régions d'ADN simple brin complémentaires et ce même si elles sont préalablement recouvertes de SSB (Xu *et al.*, 2010). L'hypothèse d'un rôle de DdrB dans un mécanisme de réparation de l'ADN de type SSA, indépendant de RecA, est renforcée par le suivi de la cinétique de réparation du génome après irradiation. Après irradiation, un simple mutant $\Delta ddrB$ montre un retard de réparation de l'ADN de 1h environ par rapport à une souche sauvage (Xu *et al.*, 2010, Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) et un double mutant $\Delta ddrB \Delta recA$ ne montre aucune reconstitution tardive du génome contrairement à ce qui est observé chez un simple mutant $\Delta recA$ (Xu *et al.*, 2010). DdrB jouerait donc un rôle crucial dans un mécanisme RecA-indépendant de réparation des cassures double brin de l'ADN et le laboratoire a proposé un rôle crucial de DdrB dans un mécanisme de type SSA pour la réparation des plus petits fragments d'ADN avant la mise en place de l'ESDSA (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). DdrB serait également la protéine qui permettrait la reconstitution lente après irradiation d'un génome en absence de RecA par un mécanisme de type SSA (Xu *et al.*, 2010).

L'analyse du protéome de *D. radiodurans* après exposition à une dose de 6 kGy de rayons γ montre que la quantité de DdrB augmente à partir de 30 minutes après irradiation alors qu'une augmentation de la quantité de RecA n'est visible qu'une heure après irradiation (Basu & Apte,

2012). Les protéines DdrB et RecA sont recrutées toutes les deux au nucléoïde après irradiation. 50% des cellules présentent une localisation de DdrB au nucléoïde dès 30 minutes après irradiation (dose 3,8 kGy) puis, 120 minutes après irradiation, la protéine DdrB se relocalise à l'extérieur du nucléoïde (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) tandis que la protéine RecA, recrutée plus tardivement au nucléoïde, y est encore présente 180 minutes après irradiation (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). Il est proposée que DdrB participe à une première ligne de défense contre les dommages de l'ADN engendrés par l'irradiation en protégeant les extrémités simple brin et/ou en réparant certaines cassures de l'ADN par SSA avant que l'ESDSA ne soit mis en place (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011)).

D'autres études du laboratoire ont permis de montrer l'implication de DdrB dans un mécanisme de type SSA nécessaire à la transformation de *D. radiodurans* par des plasmides. Un mutant $\Delta ddrB$ montre une diminution de 100 fois de la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique par rapport à une souche sauvage ou à une souche $\Delta recA$. L'établissement d'un plasmide dans une cellule (*S. pneumoniae*, *B. subtilis*) après transformation est un mécanisme RecA-indépendant nécessitant la re-circularisation des fragments simples brins entrés dans la cellule par appariement au niveau de régions homologues suivi du comblement des brèches simple brin par une polymérase (Figure 22). Il est donc proposé que DdrB soit impliqué dans cette étape (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) (voir également la partie RESULTATS, chapitre 2).

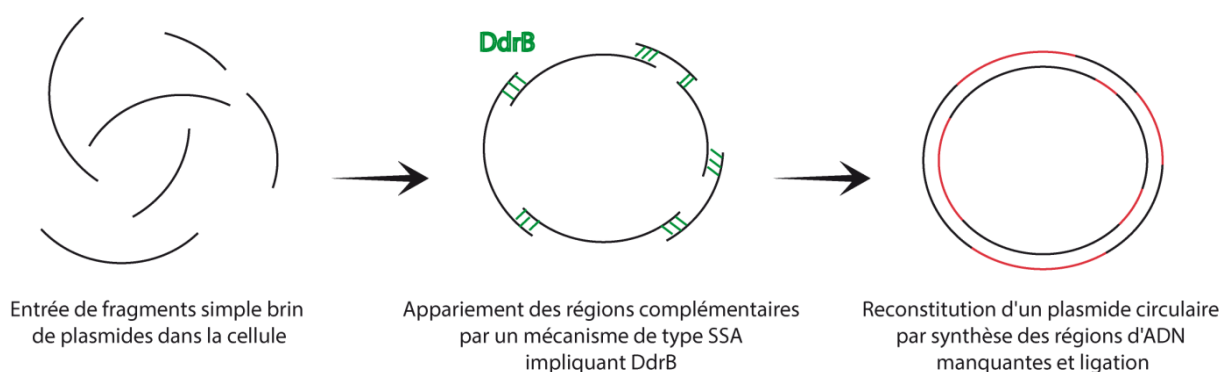


Figure 22 : Implication de DdrB dans la transformation de *D. radiodurans* par de l'ADN plasmidique.

La cristallisation du complexe DdrB/ADNsb a permis de proposer deux mécanismes possibles pour l'appariement des régions d'ADN simple brin complémentaires (Sugiman-Marangos *et al.*, 2013). DdrB forme des pentamères (également décrit par (Norais *et al.*, 2009)) en forme d'anneau interagissant avec 8 nucléotides de l'ADNsb. Les pentamères interagissent entre eux pour former des complexes plus gros. Cette interaction ne semble pas nécessaire pour la fixation d'un pentamère sur l'ADNsb mais probablement pour permettre d'étendre la surface de fixation à l'ADNsb. L'appariement pourrait se faire selon deux mécanismes : dans le premier (Figure 23A), les deux brins d'ADNsb passeraient dans des sillons différents de pentamère en pentamère ; dans le deuxième (Figure 23B), les deux molécules d'ADN simple brin seraient prises en charge indépendamment par différents pentamères et les deux brins seraient présentés face à face, les bases dirigées vers l'extérieur du pentamère.

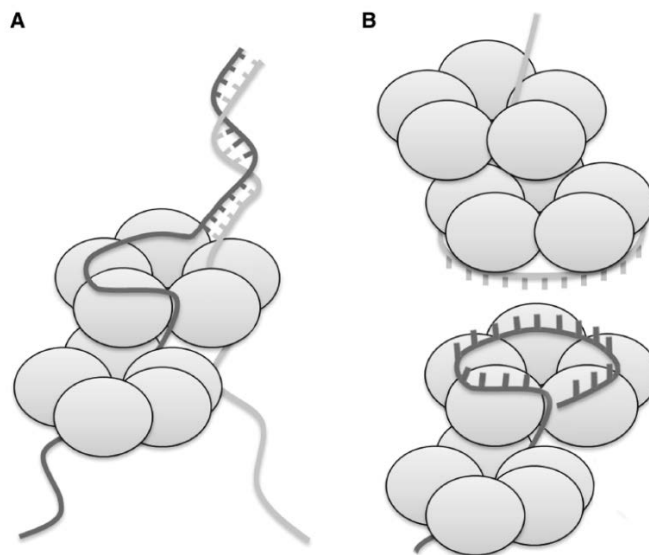


Figure 23 : Deux modèles d'appariement d'ADN simple brin médié par DdrB (Sugiman-Marangos *et al.*, 2013).

(A) modèle d'appariement des régions complémentaires via le passage des deux brin d'ADN au travers de deux sillons formés par les pentamères de DdrB.

(B) modèle d'appariement des régions simple brin présentées face à face par deux pentamères de DdrB.

b) Le NHEJ

Le NHEJ pour « Non Homologous End Joining » est un autre mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN indépendant de RecA. Il consiste au recollement d'extrémités double brin et contrairement aux autres mécanismes de réparation, il ne nécessite pas d'homologie entre les molécules à réparer. Plusieurs étapes sont nécessaires : l'identification des extrémités, leur rapprochement (synapse), et leur ligature.

Chez les Eucaryotes, le NHEJ est le mécanisme principal de réparation des cassures double brin de l'ADN dans des cellules quiescentes en phase G1. Il implique plusieurs gros complexes protéiques. Le complexe Ku70-Ku80 reconnaît les extrémités de l'ADN, se fixe dessus et les protège de la dégradation. Ku recrute ensuite la protéine DNA-PKcs qui favorise la ligation entre les extrémités par la DNA ligase IV-XRCC4. D'autres facteurs comme Artemis ou une polynucléotide kinase peuvent être recrutés si les extrémités nécessitent d'être maturées ainsi qu'une polymérase de la famille X afin de générer des extrémités pouvant être ligaturées (pour revues : (Pastwa & Blasiak, 2003), (Waters *et al.*, 2014)) (Figure 24, panneau gauche).

Longtemps considéré comme inexistant chez les procaryotes, en 2001, des études bio-informatiques ont permis d'identifier des homologues de Ku. Le NHEJ chez les bactéries a été principalement étudié chez *M. tuberculosis* et *B. subtilis* (pour revues : (Brissett & Doherty, 2009); (Matthews & Simmons, 2014)) (Figure 24, panneau droit). A l'inverse de ce qui est connu chez les Eucaryotes, le NHEJ chez les Procaryotes n'implique que quelques gènes et repose sur 2 protéines : un homologue de Ku qui reconnaît les extrémités et les juxtapose et LigD, la ligase qui, chez *Mycobacterium tuberculosis*, possède en plus de cette activité, une activité nucléase 3'→5' pour maturer les extrémités, et une activité polymérase (Della *et al.*, 2004).

D. radiodurans n'exprime pas d'homologue des protéines Ku. Il avait été proposé que la protéine PprA, présentant *in vitro* la capacité de se fixer aux extrémités de l'ADN double brin, de les protéger de la dégradation et de stimuler une activité ligase, participe à un mécanisme RecA-indépendant de réparation de l'ADN de type NHEJ (Narumi *et al.*, 2004). Depuis, il a été montré que PprA joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes après irradiation et n'intervient pas dans la réparation de l'ADN par un mécanisme RecA-indépendant puisque les doubles mutants $\Delta pprA \Delta recA$ n'ont pas de retard ou de diminution de réparation de l'ADN aggravés en comparaison d'un simple mutant $\Delta recA$ (Devigne *et al.*, 2013). Il n'y a donc actuellement aucune évidence en faveur de l'existence d'un mécanisme de type NHEJ chez *D. radiodurans*.

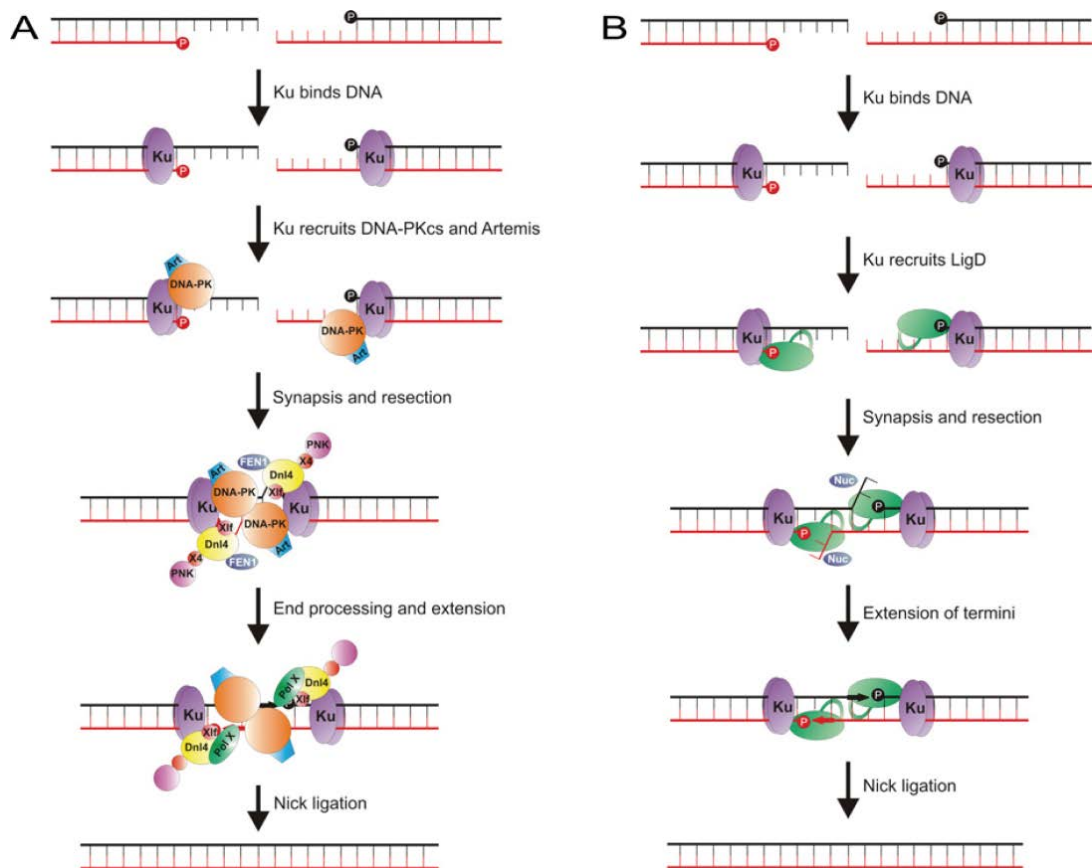


Figure 24 : Voies de réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ chez les Eucaryotes (A) et chez *M. tuberculosis* et *B.subtilis* (B). (Brissett & Doherty, 2009)

(A) L'hétérodimère Ku70-Ku80 se fixe sur les extrémités des fragments d'ADN. La sous unité catalytique de DNA-PK (DNA-PKcs) et Artemis (Art) sont recrutés et l'activité de DNA-PKcs est initiée. DNA-PKcs juxtapose les extrémités et la DNA ligase IV (Dnl4) et ses facteurs associés XRCC4 (X4) et XLF sont recrutés. PolX, comble les brèches si nécessaires, Dnl4 ligue les extrémités et Fen1, une endonucléase coupe si nécessaire, les extrémités flottantes.

(B) l'homodimère Ku se fixe sur les extrémités de l'ADN et recrute LigD. Ensemble, elles permettent la juxtaposition des extrémités et l'étape de synapse. Les activités nucléase et polymérase de LigD et peut-être d'autres facteurs terminent la maturation des extrémités si besoin puis l'activité ligase de LigD répare la cassure.

2. Réparation des bases et des nucléotides endommagés

Les lésions présentes au niveau des bases et des nucléotides sur la molécule d'ADN peuvent également compromettre la réplication et la transcription. Ces lésions peuvent être des obstacles bloquant l'avancement de ces machineries ou bien être source de mutations lors de ces processus. La réparation de ces lésions avant réplication est importante pour le maintien de l'intégrité du génome (pour revue : (Goosen & Moolenaar, 2008)).

A. Réparation par excision des bases endommagées : « Base excision repair » (BER)

Comme il a été décrit dans le paragraphe II.1, les ROS, les rayonnements ionisants ainsi que les agents alkylants peuvent induire des modifications des bases de l'ADN qui lorsqu'elles ne sont pas réparées rapidement peuvent engendrer des problèmes de réplication et des mutations. Un mécanisme de réparation par excision des bases endommagées ou BER (Base Excision Repair) permet d'éliminer ces bases endommagées de l'ADN (Figure 25A).

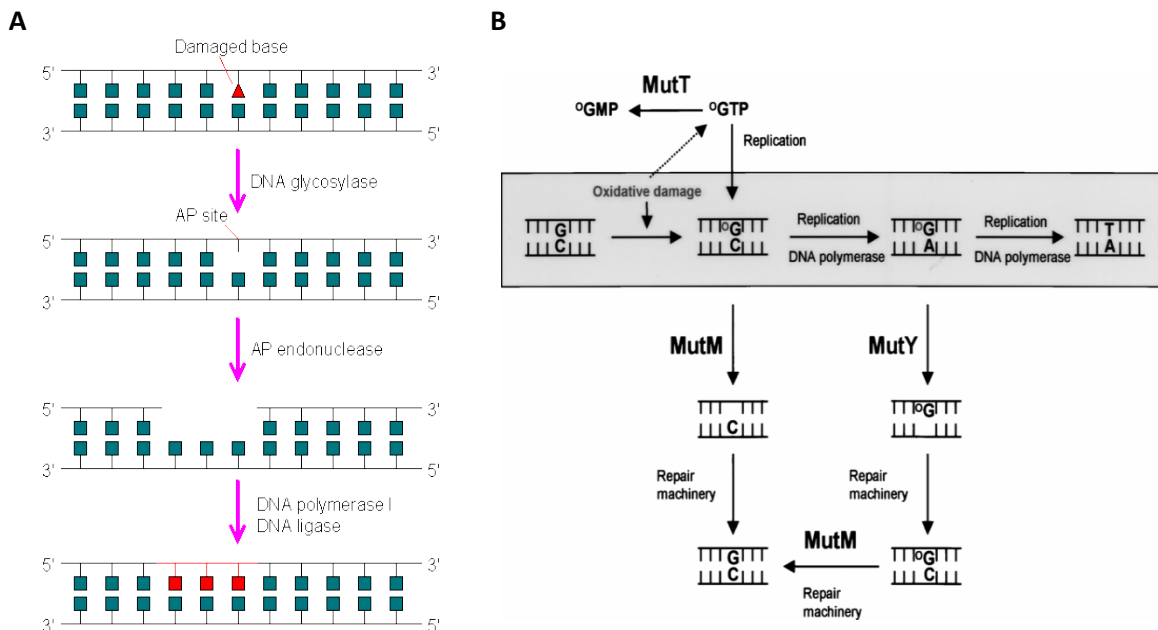


Figure 25: Réparation des bases endommagées chez *E. coli* par excision de bases

(A) Étapes du BER chez *E. coli*. (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7G.htm>) (B) Rôles de MutT, MutY et MutM dans la tolérance du stress oxydant (Sampson *et al.*, 2005).

Lors de ce processus, des DNA glycosylases, spécifiques de la lésion à éliminer, hydrolysent la liaison située entre la base endommagée et le désoxyribose. En résulte un site abasique (AP) qui est reconnu par une AP endonucléase qui clive la liaison phosphodiester en 5' du site abasique. Cette extrémité 5'-P-désoxyribose est ensuite enlevée par une exonucléase ou une désoxyribophosphodiesterase (dRpase) générant une brèche dans la molécule d'ADN. Celle-ci est par la suite comblée par une polymérase (Pol I chez *E. coli*) et une ADN ligase (Figure 25A) (pour revue : (Kow, 1994))

Comme décrit dans le tableau 2, *D. radiodurans* possède plusieurs enzymes impliquées dans la réparation des bases endommagées :

_ Des ADN glycosylases dont la fonction est d'exciser des bases endommagées de l'ADN (Figure 22) : deux homologues (DR2074 et DR2584) de AlkA, une protéine spécialisée dans la réparation des bases alkylées, deux homologues (DR0689 et DR1751) de UNG, une protéine spécialisée dans la réparation des uraciles, un homologue de MutM (DR0493) capable d'exciser les guanines oxydées de l'ADN et un homologue de MutY (DR2285) qui reconnaît les mésappariements entre des guanines oxydées et des adénines et excise l'adénine (Figure 25B).

_ Des endonucléases : trois endonucléases III de type Nth (DR0928, DR2438, DR0289), une AP-endonucléase de type Xth (DR0354) et une endonucléase de type V, Nfi (DR2162).

_ Des hydrolases dont la fonction est de détoxifier le pool de nucléotides. On retrouve MutT qui hydrolyse les d-8oxo-GTP en d-8oxo-GMP et plus de 20 autres hydrolases du type Nudix (Makarova *et al.*, 2001).

La désamination des cytosines entraîne leur modification en uracile dans la molécule d'ADN. Chez *D. radiodurans*, l'activité uracile ADN glycosylase est majoritairement portée par DR0689 qui est capable d'exciser les uraciles dans les paires U:G et U:A dans l'ADNdb ainsi que les uraciles dans l'ADNsb. La deuxième uracile ADN glycosylase DR1751 est plus active sur de l'ADNsb ((Sandigursky *et al.*, 2004) ; (Bauche & Laval, 1999) ; (Masters *et al.*, 1991)).

Parmi les modifications de bases, l'oxydation des guanines en 8-oxo-guanine (^oG) est une des plus génotoxiques. De par sa forte stabilité, elle peut ne pas être reconnue comme une base endommagée, et au contraire entraîner des mésappariements de type A:^oG à un taux très élevé lors de la réplication et entraîner des conversions de paires G:C en paires T:A. C'est une des lésions de l'ADN les plus mutagènes. Chez *E. coli*, trois enzymes sont impliquées dans la tolérance des ^oG : MutM (Fpg), MutY et MutT (Figure 25B). MutM enlève les bases ^oG dans des appariements ^oG:C. Si

des bases oxydées ont été incorporées dans l'ADN et que la réplication a eu lieu avec formation de mésappariement A:°G, MutY les corrige en enlevant l'adénine générant un site abasique en face de la guanine oxydée °G. Si une cytosine est ensuite incorporée en face de °G, MutM pourra par la suite exciser la guanine oxydée. MutT hydrolyse le GTP oxydé présent dans la cellule afin de l'éliminer et éviter son incorporation dans l'ADN lors de la réplication. *D. radiodurans* possède les homologues de MutM, Mut Y et MutT. L'expression de la protéine DrMutY est capable de compléter un simple mutant $\Delta mutY$ chez *E. coli* (Li & Lu, 2001).

On observe chez des simple, double ou triple mutants dans les gènes codant des endonucléases Nth, une augmentation du taux de mutagénèse spontanée, en particulier des substitutions de paires G:C en paires A:T. En revanche, les simple ou double mutants ne présentent pas de perte de viabilité après irradiation ou traitement par H₂O₂ probablement du fait de la reconnaissance d'un type de substrats par plusieurs de ces endonucléases ou la substitution par d'autres mécanismes de type NER (Hua *et al.*, 2012).

B. Réparation des nucléotides endommagés : « Nucleotide excision repair » (NER)

Un autre mécanisme, le NER (Nucleotide Excision Repair), permet la réparation des nucléotides endommagés, grâce à l'excision d'un patch de nucléotides englobant la lésion. Il est notamment impliqué dans l'excision des dimères de thymines engendrés par l'exposition aux rayons UV. Chez *E. coli*, ce mécanisme implique le complexe UvrABC. UvrA et UvrB se fixent sur la lésion. UvrB sépare ensuite les deux brins d'ADN puis la protéine UvrA est relarguée. UvrB exerce une légère distorsion de la molécule d'ADN ce qui permet à UvrC de s'y fixer. UvrC possède deux activités nucléases qui clivent la liaison phosphodiester 8 nucléotides en 5' et 4 à 5 nucléotides en 3' du site endommagé. UvrD déplace UvrB et le patch de nucléotides excisés puis la DNA polymérase I comble la brèche en prenant pour matrice le deuxième brin non clivé (Figure 26) (pour revue : (Kisker *et al.*, 2013))

La bactérie *D. radiodurans* possède un système d'excision des nucléotides semblable à celui d'*E. coli*. Elle possède des homologues d'UvrA (UvrA1 DR1771, UvrA2 DRA0188) d'UvrB (DR2275), d'UvrC (DR1354) et d'UvrD (DR1775). *D. radiodurans* possède également un autre système de réparation des lésions provoquées par les rayons UV semblable à celui retrouvé chez *Schizosaccharomyces pombe*, le système UVER (McCreedy *et al.*, 2000) impliquant la protéine UVDE. UVDE reconnaît la lésion et les deux poches présentes dans sa structure permettent de prendre en charge le dimère de pyrimidines d'une part et les purines complémentaires d'autre part, ceci les expose hors de la double hélice puis UVDE clive en 5' de la lésion (Yonemasu *et al.*, 1997, McCreedy *et al.*, 2000, Meulenbroek

et al., 2013). En résulte une brèche qui sera comblée par une polymérase et une extrémité 5' flottante qui sera clivée par une endonucléase (Figure 27).

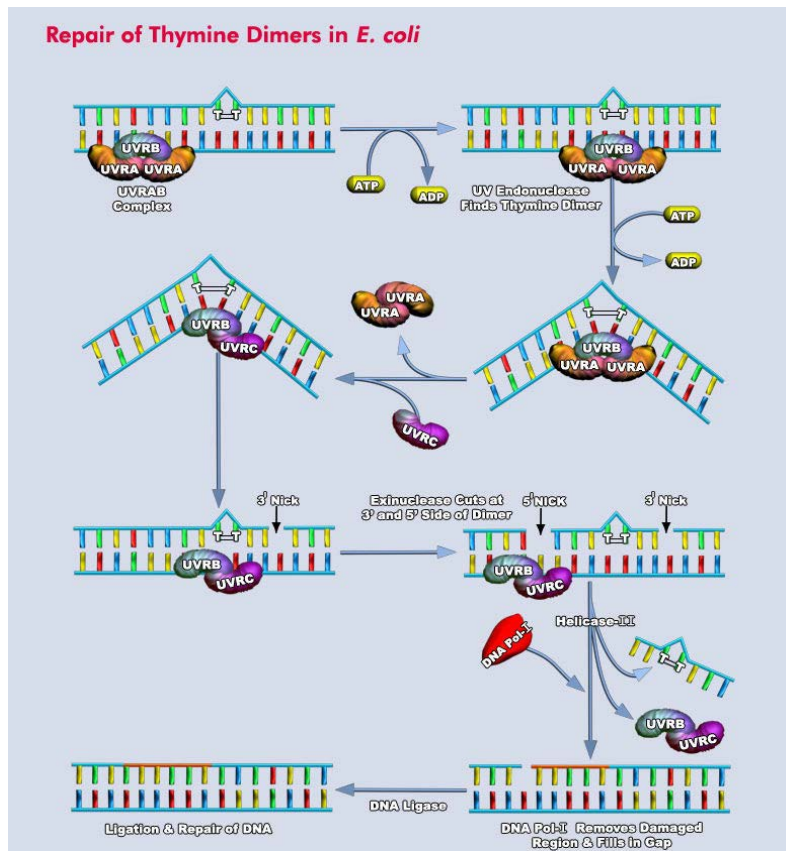


Figure 27 : Réparation des dimères de thymine par excision de nucléotide (NER) chez *E. coli* (<https://www.qiagen.com/fr/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=391&action=Accept>)

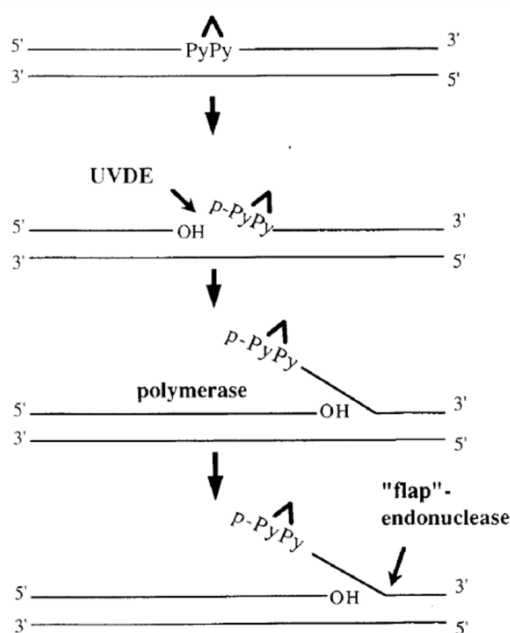


Figure 26 : Système d'excision des dimères de pyrimidines par UVDE chez *S. pombe*. (Yonemasu et al., 1997)

La bactérie *D. radiodurans* possède un homologue de UVDE, l'endonucléase UvsE (Earl *et al.*, 2002b). Ces auteurs n'observent pas de réduction de la résistance aux UV dans des simples mutants dépourvus de la protéine UvsE ou de la protéine UvrA1. Par contre Tanaka et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence une légère diminution de la résistance aux UV de ces mutants s'ils sont exposés à des doses très élevées de rayonnement UV (1500 J/m² pour le mutant $\Delta uvsE$ et 900 J/m² pour le mutant $\Delta uvrA1$). En revanche un double mutant $\Delta uvsE \Delta uvrA1$ montre une forte sensibilité aux UV et une accumulation de dimères de pyrimidines non réparés (Tanaka *et al.*, 2005), ce qui suggère que les systèmes NER et UVER sont actifs chez *D. radiodurans*, chacun pouvant prendre en charge les lésions provoquées par les UV quand l'autre système n'est pas fonctionnel. En revanche, la protéine UvrA2 ne semble pas impliquée dans ces mécanismes, puisque la délétion du gène *uvrA2* ne modifie pas les phénotypes observés chez les simples mutants $\Delta uvsE$ ou $\Delta uvrA1$ ou chez le double mutant $\Delta uvsE \Delta uvrA1$.

C. Correction des mésappariements : « Mismatch repair » (MMR)

Le système de correction des mésappariements permet d'augmenter la fidélité de la réplication et de la recombinaison. Il permet également la reconnaissance de mésappariements avec des bases ayant subi des dommages mais il semblerait que, dans ce cas, ce système reconnaisse plus une déformation de la molécule d'ADN qu'un type de lésion en particulier. Chez *E. coli*, ce mécanisme implique la reconnaissance du mésappariement par un homodimère ou homotétramère de MutS qui recrute ensuite MutL. Le complexe MutS-MutL recrute ensuite l'endonucléase MutH qui clive le brin néo-synthétisé et non méthylé au niveau d'un site GATC en 5' ou 3' du mésappariement. L'hélicase UvrD déplace ensuite le brin incisé ce qui l'expose à des nucléases simple brin. Les étapes finales de re-synthèse et de ligation sont assurées par Pol III et une ADN-ligase (pour revue : (Joseph *et al.*, 2006, Iyer *et al.*, 2006, Kunkel & Erie, 2005) (Figure 28).

D. radiodurans possède un système de réparation des mésappariements fonctionnel impliquant MutS1 (DR1039), MutL (DR1696) et UvrD (DR1775). L'inactivation de *mutS1* ou *mutL* induit une augmentation de 7 fois de la fréquence spontanée de mutants [Rif^R] (Mennecier *et al.*, 2004). Elle induit également une augmentation de 10 fois de l'efficacité d'intégration d'un marqueur de sélection lors de la transformation si la séquence d'ADN à intégrer dans le génome a une divergence de séquence de seulement un nucléotide par rapport à la séquence présente dans le génome de la bactérie hôte. La reconnaissance du mésappariement par MutS1 et MutL est suffisante pour faire avorter la recombinaison (Mennecier *et al.*, 2004). *D. radiodurans* possède un deuxième homologue de MutS, MutS2 mais son rôle dans le MMR n'a pas été établi puisqu'un simple mutant $\Delta mutS2$ ne présente pas de phénotype et que le double mutant $\Delta mutS1 \Delta mutS2$ présente le même phénotype

qu'un simple mutant $\Delta mutS1$. Il n'y a pas d'homologue de MutH, chez *D. radiodurans*, ce qui pose la question de discrimination entre le brin parental et le brin néo-synthétisé. Les souches dépourvues de MutS1 et MutL ne sont pas plus sensibles aux rayons γ , à la mitomycine C ou aux UV qu'une souche sauvage, ce qui suggère que le MMR n'est pas requis pour la survie des cellules après ces traitements (Mennecier *et al.*, 2004), d'autres mécanismes étant capables de réparer efficacement les lésions.

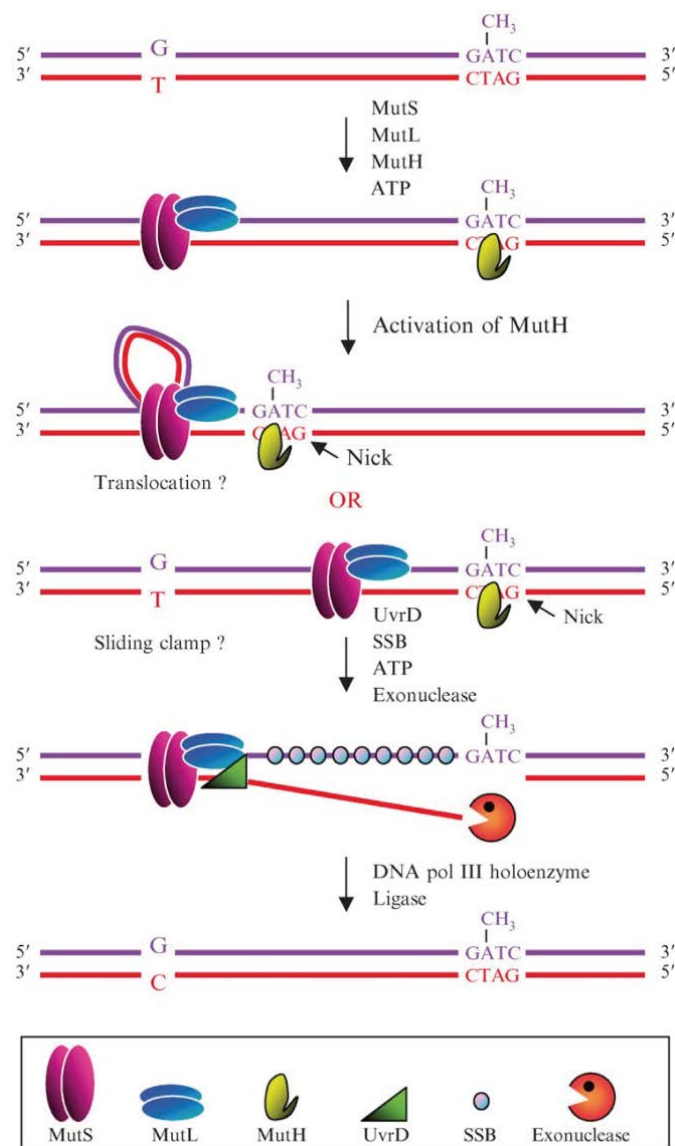


Figure 28 : Réparation des mésappariements (MMR) chez *E. coli*. (Joseph *et al.*, 2006)

3. Blocage de la fourche de réplication au niveau de lésions encombrantes et mécanismes de sauvetage de la fourche

La persistance de bases ou de nucléotides endommagés dans l'ADN est problématique pour la réplication. La présence de certaines bases endommagées n'entraîne pas de blocage de la fourche de réplication car l'ADN polymérase est capable d'insérer un nucléotide en face de la base endommagée même si le nucléotide inséré n'est pas le nucléotide attendu et, de ce fait, la réplication de l'ADN endommagé peut engendrer de façon directe une augmentation de la mutagénèse. Dans d'autres cas, si l'ADN matrice contient des lésions plus encombrantes, l'ADN polymérase n'est pas capable d'insérer de nucléotide en face de la lésion et s'arrête (Figure 29, A et B). Plusieurs scénarios sont alors possibles :

1. La réplication est réinitiée en aval de la lésion que ce soit par l'initiation d'un nouveau fragment d'Okazaki sur le brin lagging ou la réinitiation de la réplication sur le brin leading, ce qui entraîne la formation d'une brèche simple brin qui sera ensuite comblée par un mécanisme de réparation des discontinuités simple brin dépendant de RecFOR, RecA et RuvABC (Figure 29C et 31) (pour revue : (Michel *et al.*, 2007)).
2. La fourche de réplication est bloquée par les lésions rencontrées sur l'ADN matrice du brin leading. La réinitiation de la réplication se fera selon un modèle de régression de fourche et de réactivation du réplisome. L'extrémité 5' du dernier fragment d'Okazaki sur le brin lagging est un substrat reconnu par l'hélicase RecQ puis par l'exonucléase RecJ (Figure 29 D). La lésion qui était localisée sur le brin leading se retrouve à nouveau après régression de la fourche dans un ADNdb et peut de nouveau être prise en charge par le système NER. La fixation de RecA via la voie RecFOR sur les régions simple brin au niveau de la fourche permettrait de protéger l'ADN d'une dégradation trop étendue. La réactivation d'un réplisome est dépendante de PriA.

La protéine UvrD pourrait intervenir dans le processus grâce à son activité anti-RecA afin de défaire les structures toxiques formées par l'action combinée de RecQ, RecJ, RecFOR et RecA au niveau d'une fourche de réplication bloquée (Figures 30 et 31) (pour revue : (Michel *et al.*, 2007)). L'autre alternative consiste à répliquer l'ADN au travers de la lésion via une synthèse translésionnelle. Cette synthèse translésionnelle est réalisée par des polymérases spécialisées. Chez *E. coli*, ce sont les polymérases Pol IV (DinB), Pol V (UmuD'₂C) et Pol II qui sont impliquées dans ce processus (pour revues : (Fuchs & Fujii, 2013, Bichara *et al.*, 2011)). L'ADN-polymérase répliquative est déplacée au profit de l'ADN-polymérase translésionnelle (Figure 32). La région synthétisée par l'ADN polymérase translésionnelle doit être suffisamment longue (au moins 4-5 nucléotides) pour ne pas être dégradée par l'activité de relecture « proofreading » de l'ADN polymérase répliquative lorsque cette dernière reprend la synthèse. Ce mécanisme est source de

mutations ponctuelles, les polymérases translésionnelles étant dépourvue d'activité « proofreading » et incorporant souvent des bases « non complémentaires » en face des lésions.

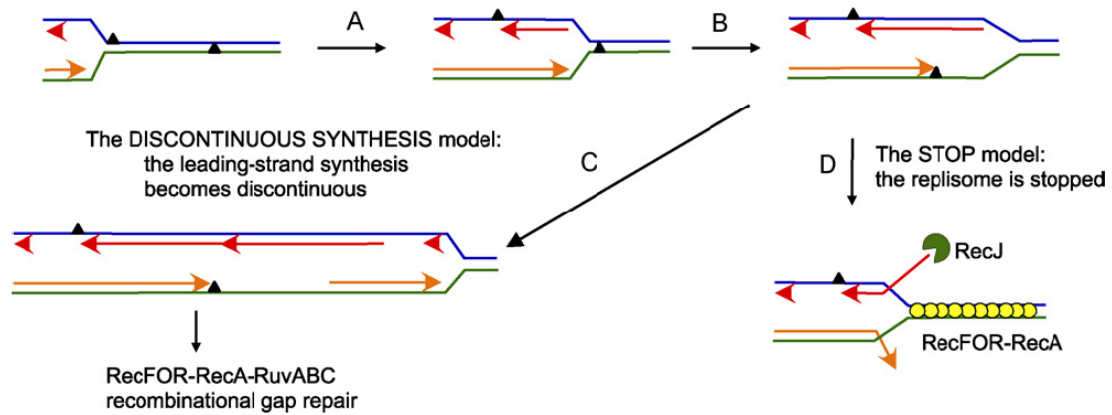


Figure 29 : Voie RecFOR de sauvetage de fourches de réplication lors de la rencontre de lésions sur l'ADN matrice. (Michel *et al.*, 2007).

(A, B, C) La fourche de réplication rencontre une lésion sur le brin lagging ou sur le brin leading, la réinitiation de la réplication en aval des lésions laisse des régions simple brin qui seront réparées par recombinaison homologe via la voie RecFOR-RecA-RuvABC.

(A, B, D) La fourche de réplication s'arrête après avoir rencontré une lésion sur chacun des brins matrices. La fourche de réplication est reconstituée selon un mécanisme de régression de fourche faisant intervenir la dégradation des régions néosynthétisées et la réinitiation d'un réplisome.

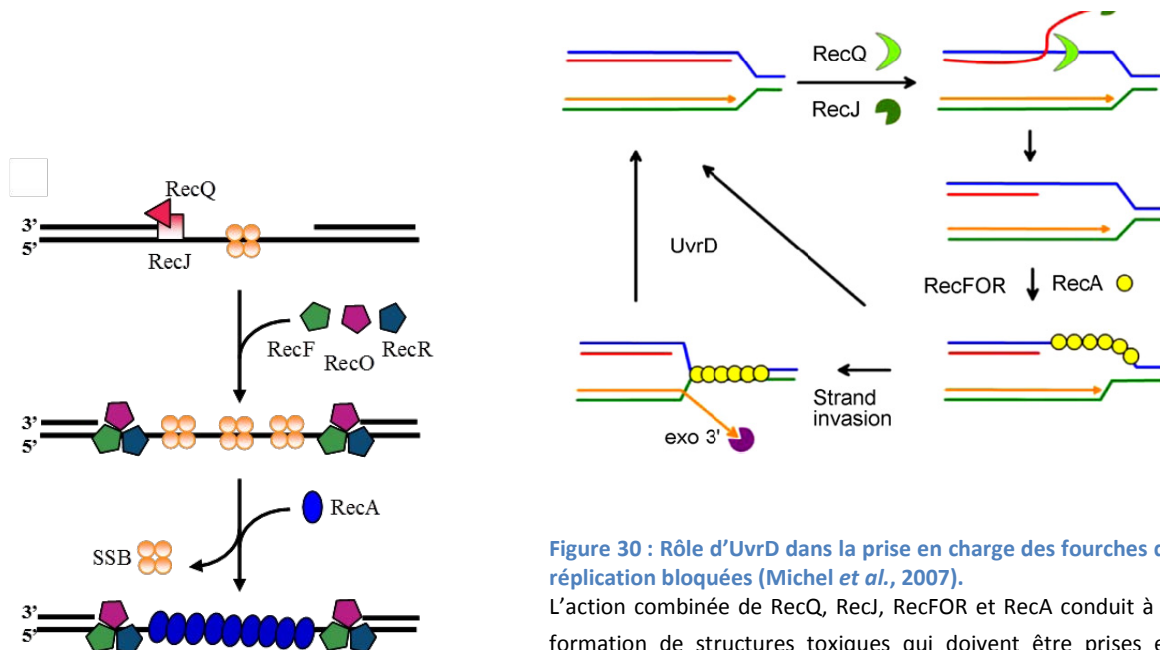


Figure 31: Initiation de la réparation des discontinuités simple brin par la voie RecFOR (adapté de (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003))

Figure 30 : Rôle d'UvrD dans la prise en charge des fourches de réplication bloquées (Michel *et al.*, 2007).

L'action combinée de RecQ, RecJ, RecFOR et RecA conduit à la formation de structures toxiques qui doivent être prises en charge par UvrD pour permettre un redémarrage de la fourche de réplication. Les lignes bleues et vertes correspondent aux brins matrices, les lignes orange et rouges aux brins néosynthétisés.

La synthèse translésionnelle, processus mutagène, est une solution de dernier recours. La polymérase translésionnelle Pol V n'est présente chez *E. coli* que lorsque la réponse SOS est activée. En effet l'opéron *umuDC* est contrôlé par le répresseur LexA, de plus la protéine UmuD doit être activée par clivage pour former UmuD' et ce clivage est tardif (Sommer *et al.*, 1998).

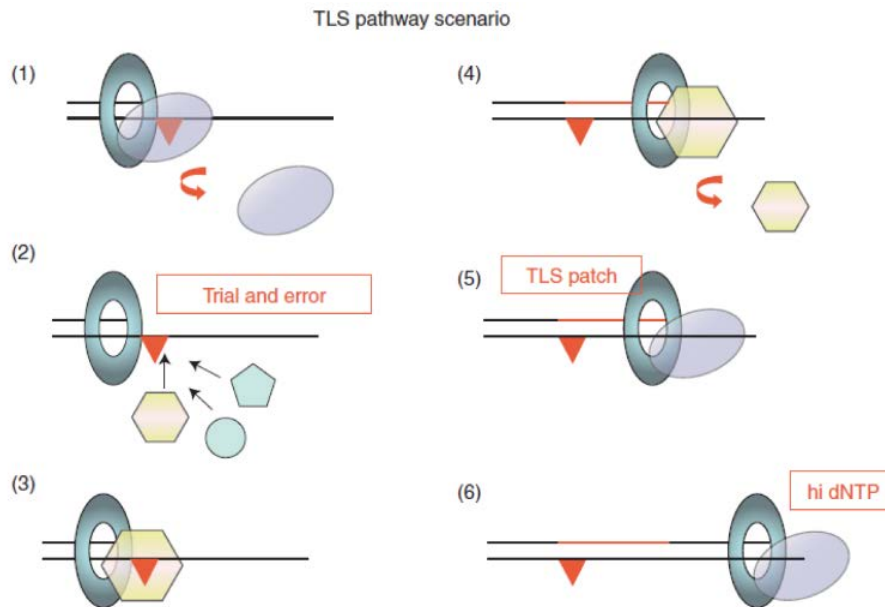


Figure 32 : Principe de la synthèse translésionnelle (TLS) chez *E. coli*. (Fuchs & Fujii, 2013).

- (1) L'ADN polymérase répliquative se dissocie du replisome après avoir rencontré une lésion laissant sa place vacante.
- (2) L'ADN polymérase répliquative est remplacée par une ADN polymérase translésionnelle. A ce jour aucun mécanisme de sélection de l'ADN polymérase translésionnelle n'a été découvert, ce processus semble être stochastique et toutes les combinaisons peuvent être testées.
- (3) L'ADN polymérase translésionnelle sélectionnée est celle capable de passer au travers de la lésion ayant provoqué l'arrêt de la fourche.
- (4) L'ADN polymérase translésionnelle en association avec le β -clamp, synthétise un patch de nucléotides suffisamment long pour ne pas être soumis à l'activité exonucléase de l'ADN polymérase répliquative.
- (5) Et (6) L'ADN polymérase translésionnelle se dissocie laissant de nouveau la place à l'ADN répliquative. L'activité de synthèse de l'ADN polymérase répliquative est favorisée par rapport à son activité exonucléase grâce à une augmentation du pool de dNTP (hi dNTP).

Chez *D. radiodurans*, l'analyse du génome n'a mis en évidence aucune polymérase putative de la famille Y dont DinB et UmuC font partie (Makarova *et al.*, 2001). Il a été montré que l'ADN polymérase I de *D. radiodurans* possède *in vitro* une activité de synthèse translésionnelle (Heinz & Marx, 2007) et cette activité pourrait rendre compte de l'augmentation des mutations ponctuelles dans le gène *rpoB* après irradiation (Mennecier *et al.*, 2006).

Il existe d'autres évènements pouvant conduire à l'arrêt de fourches de réplication entraînant la mise en place de mécanismes spécifiques de sauvetage des fourches chez *E. coli* :

La présence d'une cassure simple brin sur le brin matrice (Figure 33) : Lorsque le réplisome rencontre ce genre de lésion, le réplisome se dissocie conduisant à la formation d'une cassure double brin au niveau de la lésion. Cette extrémité devient alors un substrat pour la voie RecBCD et l'envahissement de la molécule homologue catalysée par RecA permet après résolution des jonctions de Holliday par RuvABC de former une structure en D-loop qui avec l'aide de PriA reconstituera une fourche de réplication (pour revue : (Michel *et al.*, 2007)).

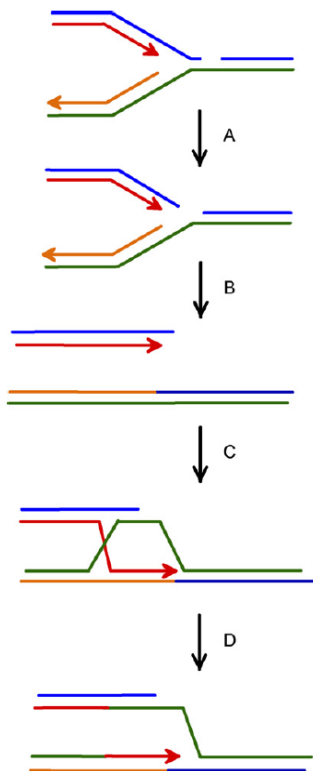


Figure 33 : Le modèle « Replication fork collapse » ((Michel *et al.*, 2007))

A : La fourche de réplication rencontre une cassure simple brin sur le brin « leading »

B : Le réplisome se dissocie de l'ADN laissant une extrémité double brin

C : RecBCD initie la réparation par recombinaison homologue à partir de l'extrémité double brin

D : Les jonctions de Holliday sont résolues. La réplication redémarre, un nouveau réplisome est assemblé grâce à la protéine PriA

Les lignes bleues et vertes correspondent aux brins matrice, les lignes orange et rouges correspondent aux brins synthétisés.

La déficience de protéines du réplisome conduisant au ralentissement des fourches ou à l'augmentation de leur fréquence d'arrêt (Figure 34) : Dans ce cas, plusieurs mécanismes permettant de redémarrer la réplication et dépendant du contexte mutant étudié ont été proposés. Ces mécanismes supposent la réversion des fourches de réplication par appariement des brins néosynthétisés sur le brin leading et le brin lagging pour former une structure de type jonction de Holliday. Dans un mutant *rep*, la réversion de fourche est dépendante des protéines RuvAB, RecBCD et RecA. RuvAB stabilise la jonction de Holliday (Figure 34B) puis RecBCD se fixe sur l'extrémité double brin libre de cette structure et peut dégrader cet ADN double brin via son activité exonucléase afin de reformer une fourche pouvant être réinitialisée (Figure 34C1 et 34D) ou RecBCD peut charger RecA sur l'ADNsb qui, en catalysant l'échange de brin, va permettre de reformer une fourche pouvant être réinitialisée (Figure 34C2 et 34C3). Deux autres modèles indépendants de la voie RecBCD sont proposés dans d'autres mutants : un modèle où la fixation de RecA au niveau de région simple brin est suivie de l'invasion de la région homologue qui permet la réversion de fourche, un autre modèle où la migration de la jonction de Holliday stabilisée par RuvAB est suivie du clivage de la jonction par RuvC (Figure 34E1) induisant la formation d'une cassure double brin au niveau de la fourche (Figure 34E2) qui sera prise en charge comme décrit précédemment (Figure 33) (pour revue : (Michel *et al.*, 2007)).

Chez *D. radiodurans*, Les protéines RecB et RecC sont absentes et seules les voies indépendantes de RecBCD peuvent sauver les fourches de réplication renforçant le rôle des protéines de la voie RecFOR, de la protéine RecA et des protéines RuvAB et RuvC dans le sauvetage des fourches de réplication. On peut rappeler le lethal sectoring important des mutants *recA*, *recF*, *recO* et *recR* (Bentchikou *et al.*, 2010) et l'essentialité de la protéine RecJ, seule exonucléase 5'-3' chez *D. radiodurans* (Bentchikou *et al.*, 2010). Mes travaux récents (résultats non publiés) ont également mis en évidence l'essentialité de la protéine RuvC chez *D. radiodurans* suggérant un rôle crucial de cette protéine dans le sauvetage des fourches de réplication (voir page 99).

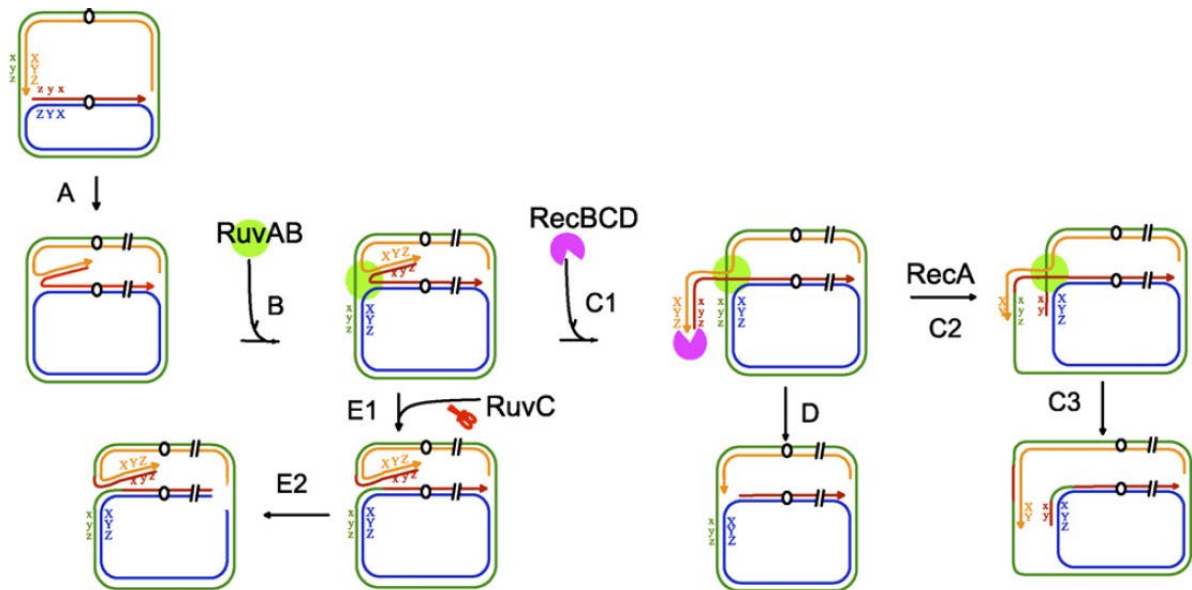


Figure 34 : Le modèle de réversion de fourche (Michel et al., 2007).

(A) : La réplication est bloquée, les deux nouveaux brins synthétisés s'hybrident pour former des jonctions de Holliday, jonctions stabilisées par la fixation de RuvAB. Le complexe RecBCD se fixe sur l'extension double brin, Ceci peut donner lieu à deux évènements 1- RecBCD initie un échange de brins RecA dépendant (C2 et C3) ou 2- RecBCD dégrade l'extension double brin jusqu'aux jonctions de Holliday et déplace le complexe RuvAB (D). Ces deux évènements permettent le redémarrage de la réplication médiée par PriA. Dans un mutant *recBC* la prise en charge des jonctions de Holliday par le complexe RuvABC produit une cassure des fourches de réplication conduisant à une linéarisation de l'ADN (E1 puis E2). Les lignes bleues et vertes correspondent aux brins matrice, les lignes orange et rouges correspondent aux brins synthétisés.

IV. Plasticité du génome chez *D. radiodurans*

1. Les éléments mobiles

Présents dans tous les règnes, les éléments mobiles participent à l'instabilité génétique. Grâce à leur capacité à s'exciser et à s'intégrer dans l'ADN, ils peuvent se déplacer ou se multiplier au sein d'un génome. Il existe plusieurs grands types de ces éléments (pour revue : (Darmon & Leach, 2014)).

Les « Insertion Sequences » (IS) : éléments transposables simples de taille de l'ordre de 2500 pb maximum ne contenant que les éléments nécessaires à leur transposition dont au moins une ORF codant pour une transposase, enzyme permettant les réactions d'intégration et d'excision et parfois une deuxième ORF impliquée dans la régulation de ces mécanismes (Figure 35 A).

Les « Miniature Inverted-repeat Transposable Elements » (MITEs) : petits éléments mobiles dérivés de séquences d'IS. Ils ne codent pas de transposase et sont dépendant de l'expression de la transposase de l'IS dont ils sont dérivés (Figure 35B).

Les transposons : pouvant être très grands (la taille de certains atteint 70 kpb), ils expriment de nombreux gènes impliqués dans leur transposition et d'autres gènes dits accessoires pouvant être impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Figure 35C).

Les transposons composites : ce sont deux IS suffisamment proches qui peuvent agir de concert et mobiliser la région d'ADN qu'elles encadrent. Très souvent, seule la transposase d'une des deux IS est active (Figure 35D).

Les transposons conjugatifs : éléments chimériques cumulant les propriétés d'intégration des bactériophages et les propriétés de transfert des plasmides conjugatifs (Figure 35E).

Les bactériophages transposables : ils se multiplient dans la cellule hôte via un mécanisme de transposition (Figure 35F).

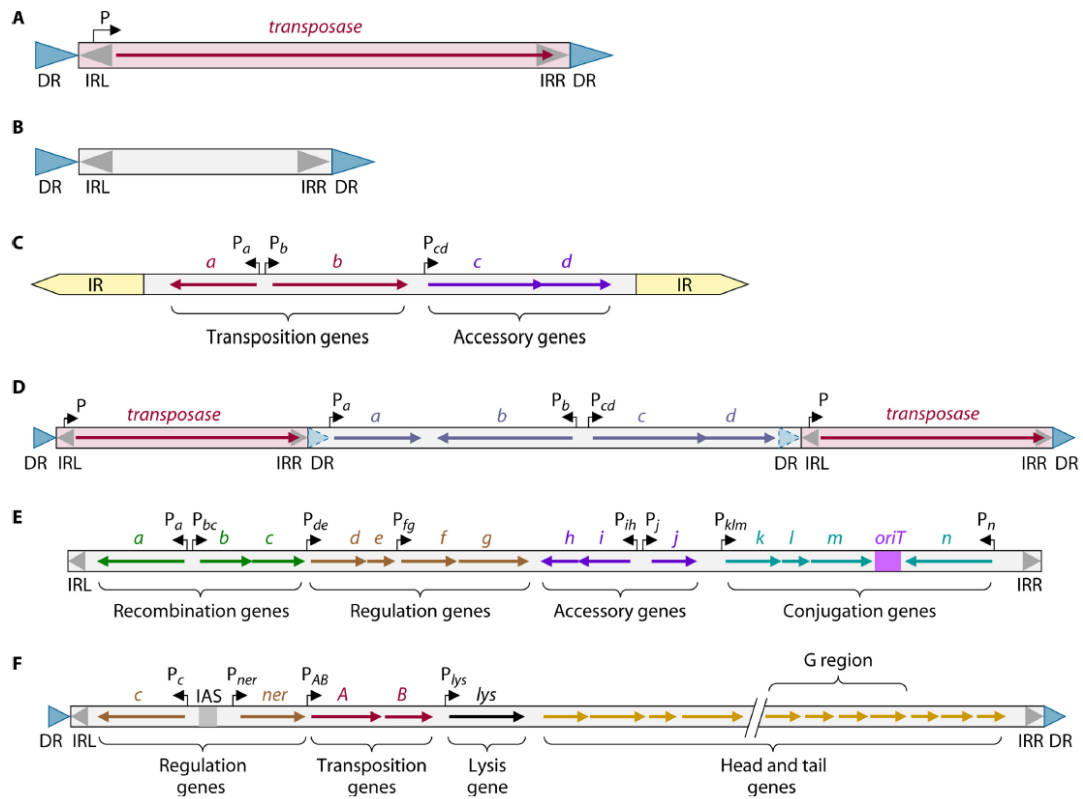


Figure 35 : Schéma de l'organisation de différents éléments mobiles intégrés dans un génome (Darmon & Leach, 2014).

DR : (Direct repeat) séquence du génome ciblée par l'élément mobile et dupliquée lors de l'intégration.

- (A) Séquence d'insertion (IS), outre le gène codant la transposase, une deuxième ORF peut être présente
- (B) MITE (Miniature inverted-repeat transposable element). Il ne code pas pour sa propre transposase
- (C) Transposon
- (D) Transposon composite. Une région de chromosome est entourée de deux IS
- (E) Transposon conjugatif. Il contient plusieurs ORF nécessaires à sa transposition, sa régulation, à la conjugaison ainsi qu'une région Ori.
- (F) Bactériophage transposable Mu

Ces types d'éléments mobiles partagent une même structure avec à leur extrémité des séquences répétées inversées ou directes plus ou moins longues nécessaires pour la transposition. Ces éléments mobiles ciblent une séquence d'insertion avec plus ou moins de spécificité. Il existe plusieurs modes de transposition (Figure 36):

La transposition par excision/ Intégration : l'élément mobile s'excise de la molécule donneuse pour s'intégrer dans une autre molécule

La transposition conservative : après transposition de l'élément mobile de la molécule donneuse vers la molécule receveuse, la cassure formée sur la molécule donneuse est réparée par recombinaison homologe. Ce mécanisme amplifie le nombre de copies du transposon dans le génome.

La transposition rélicative : l'élément transposable ne s'excise pas de la molécule donneuse. Il y a formation d'un co-intégrat où les molécules donneuse et cible sont fusionnées et où l'élément mobile est dupliqué. La résolution de cette structure par recombinaison entre les deux copies entraîne la formation de deux molécules indépendantes portant chacune une version de l'élément mobile. Ce mécanisme amplifie le nombre de copies de l'élément mobile dans le génome.

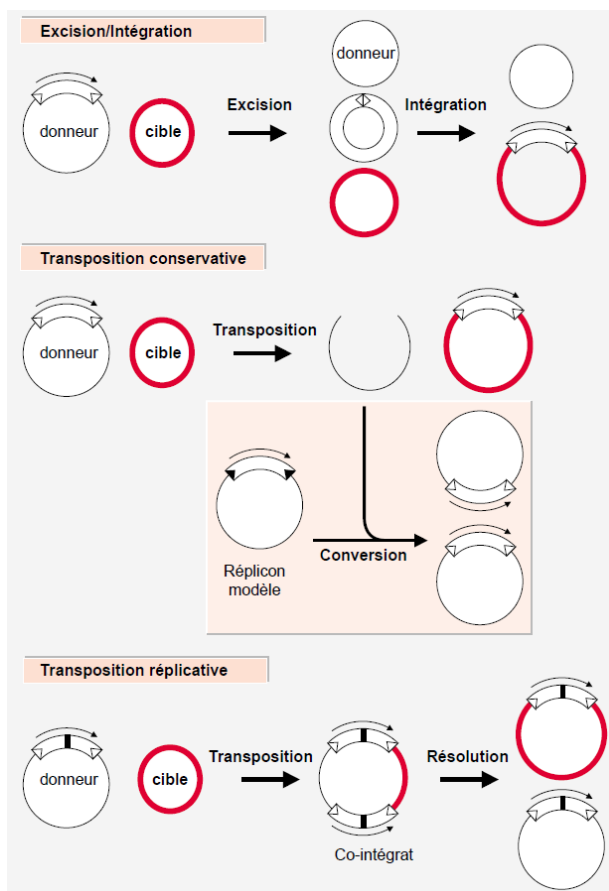


Figure 36 : Les différents mécanismes de transposition (Merlin & Toussaint, 1999)

L'intégration d'un élément mobile à un endroit du génome peut avoir plusieurs conséquences comme l'inactivation de gènes par interruption de la séquence codante, la fusion de gènes, la modification de l'expression des gènes par exemple, en introduisant un promoteur devant un gène normalement non exprimé ou par la fuite d'un promoteur interne à l'élément mobile ou encore en modifiant la topologie de l'ADN au voisinage du gène. Selon le gène concerné, l'impact sur la cellule peut être plus ou moins favorable à sa survie. L'excision des IS, lorsqu'elle est parfaite, peut restaurer l'intégrité du gène dans lequel l'IS était intégrée. Si elle est imparfaite, elle peut générer des délétions ou des cicatrices en dupliquant la séquence spécifique de quelques nucléotides dans laquelle elle s'était insérée (pour revue : (Darmon & Leach, 2014)). La mobilité de ces éléments est régulée le plus souvent par une régulation intrinsèque (promoteurs alternatifs, changement de la phase de lecture (frameshifts,...) ou indirectement exercée par l'hôte (niveau de surenroulement de l'ADN, ...) (pour revue : (Nagy & Chandler, 2004)).

Chez *D. radiodurans*, l'annotation du génome a permis de mettre en évidence la présence d'éléments mobiles de type ISs localisés sur les 4 entités génomiques (Makarova *et al.*, 1999 , Makarova *et al.*, 2001). Le nombre exact de ces éléments fait débat puisque (Makarova *et al.*, 2001) dénombrait 52 IS de 12 familles différentes dont 8 copies de l'*ISDra2* de la famille des IS2 (IS200/IS605) alors que l'utilisation d'une sonde n'a révélé la présence que de deux copies dans le génome de la souche de référence ATCC 13939 (Mennecier *et al.*, 2006). Cependant, le séquençage et l'annotation du génome par (White *et al.*, 1999) et (Makarova *et al.*, 2001) ont été faits sur la souche BAA816 différente de celle utilisée par le laboratoire (ATCC 13939) et le nombre d'ISs peut varier selon l'isolat et évoluer dans le temps en fonction des événements de transposition et de l'homogénéisation de l'information au niveau du site donneur (*D. radiodurans* est polyploïde et l'IS est excisée d'une copie de chromosome mais reste présent sur les autres copies) .

La mutagenèse spontanée liée à la transposition des ISs a été mise en évidence dans la souche ATCC 13939 prouvant que plusieurs familles d'IS sont actives chez *D. radiodurans* (Mennecier *et al.*, 2006). L'isolement et l'analyse de mutants spontanés résistants au triméthoprim ont montré que 85% des mutations inactivant le gène *thyA* était due à l'insertion d'éléments mobiles de type IS appartenant à plusieurs familles différentes : IS2, IS3, IS4, IS5 et IS2621 ainsi que d'un élément de type MITEs dérivé de l'IS2621.

Après exposition aux rayons γ ou UV, les mutants isolés restent majoritairement liés à l'insertion d'IS mais il n'y a quasiment plus qu'une seule IS mobilisée : l'*ISDra2* appartenant à la famille IS200/605 (Mennecier *et al.*, 2006). Cette IS est présente en deux copies dans le génome, mais une seule copie est fonctionnelle pour la transposition (Pasternak *et al.*, 2010). L'*ISDra2* contient deux gènes : *tnpA*

codant pour la transposase et *tnpB* qui régule négativement la transposition de l'*ISDra2* (Pasternak *et al.*, 2013) (Figure 37). La transposase de l'*ISDra2* agit sur des substrats simple brin aussi bien pour l'étape d'excision que pour l'étape d'insertion de l'*ISDra2*. La transposition se déroule en deux phases (Pasternak *et al.*, 2010) : l'IS s'excise de façon précise du génome sous forme d'un intermédiaire circulaire simple brin et s'intègre dans la molécule receveuse en 3' d'une séquence cible simple brin de 5 pb 5'TTGAT3' (Figure 37). La cinétique de transposition de l'*ISDra2* après irradiation (5kGy) suit de manière étonnante la cinétique de réparation du génome. En effet, on observe l'apparition de l'intermédiaire simple brin ainsi que la restauration de l'ADN donneur de manière concomitante avec la réparation des cassures double brin de l'ADN qui chez, *D. radiodurans*, engendre la présence transitoire de longues régions d'ADN simple brin au cours du processus ESDSA (paragraphe II.1.a). La présence de grandes quantités d'ADN simple brin substrat de la transposase de l'*ISDra2* va permettre l'induction de la transposition de cette IS après exposition à des doses massives de rayonnement UV ou γ (Pasternak *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il a été montré que l'excision spontanée de l'*ISDra2* était dépendante de la réplication. Dans des conditions normales de croissance, l'ADN simple brin est présent majoritairement au niveau des fourches de réplication et plus particulièrement au niveau du brin retardé dont la réplication se fait de manière discontinue. L'orientation de la réplication à travers l'IS influe sur son taux d'excision. Il est maximal lorsque le brin actif de l'IS est répliqué sur le brin retardé. Ce biais n'est pas retrouvé après irradiation, le mécanisme ESDSA engendrant de longs fragments d'ADNs b indépendamment de l'orientation de la réplication. De plus, il a été montré chez *E. coli*, que la fréquence d'excision de dérivés de l'*IS608*, une IS de la même famille que l'*ISDra2*, diminuait avec l'augmentation de la taille de l'IS mais que cet effet était moins drastique si l'activité de la primase ou de l'hélicase répllicative était perturbée (Ton-Hoang *et al.*, 2010).

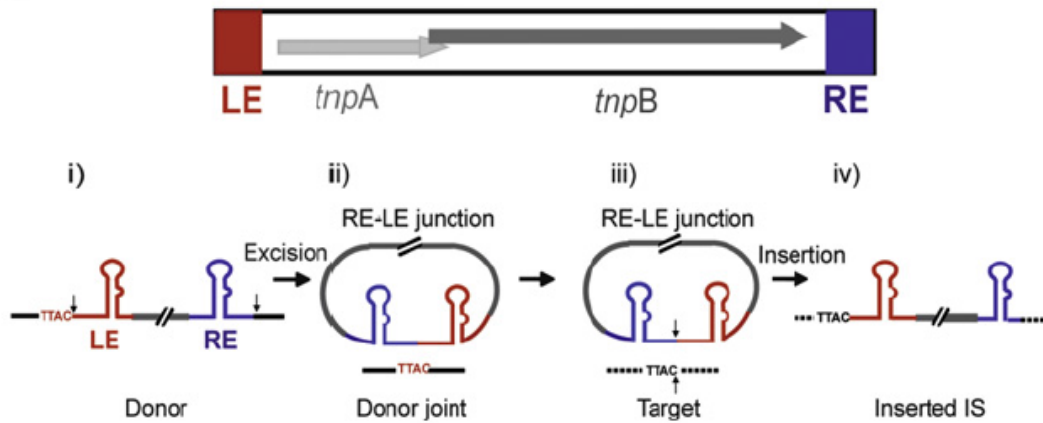


Figure 37 : Schématisation du mécanisme d'excision / intégration de l'*ISDra2* (Adapté de (Ton-Hoang *et al.*, 2010))

L'*ISDra2* code pour deux protéines, TnpA la transposase qui utilise pour substrat de l'ADN simple brin et TnpB qui régule négativement la transposition. L'*ISDra2* possède deux séquences répétées inversées à ses extrémités : LE et RE.

- i) Schéma de l'*ISDra2* intégrée dans l'ADN.
- ii) L'excision se fait de façon précise sur un seul brin d'ADN au niveau des sites de clivage (flèches noires en i) et le brin d'ADN est refermé. La jonction des régions LE et RE lors de l'excision de l'IS entraîne la formation d'un intermédiaire circulaire d'ADN simple brin.
- iii) TnpA insère l'intermédiaire circulaire simple brin dans la molécule d'ADN receveuse au niveau de la séquence cible (iv).

2. L'intégration de matériel génétique exogène et la transformation

Au cours de l'évolution, certaines espèces bactériennes ont acquis des gènes provenant d'autres espèces bactériennes ou eucaryotes. Ces gènes leur ayant apporté un avantage au cours de leur développement, ils ont été domestiqués et ont subi l'évolution propre à leur nouvel hôte. On parle de transfert horizontal de gènes. Il est communément admis que 10 à 15% des génomes bactériens sont issus de transferts horizontaux de gènes. Les mécanismes sous-jacents sont divers et reposent sur l'intégration d'ADN donneur par recombinaison dans le génome de la cellule hôte. Cet ADN peut être introduit dans la cellule par le biais d'un phage lors de la transduction, d'un plasmide ou d'un transposon conjugatif lors de la conjugaison, par l'internalisation d'ADN extracellulaire lors de la transformation ou encore via des nanotubes ou des vésicules (Figure 38) (pour revue : (Popa & Dagan, 2011)). Ces processus peuvent être la source d'une adaptation remarquable de ces organismes à leur milieu environnemental et parfois causer de graves problèmes sanitaires comme c'est le cas avec l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques (pour revue : (Furuya & Lowy, 2006)). Il faut noter que la capacité qu'ont les bactéries à internaliser de l'ADN étranger peut être un problème dans la dissémination des organismes génétiquement modifiés et la dispersion de leur matériel génétique. Plusieurs transferts de gènes entre des plantes transgéniques et leur bactérie colonisatrice ont déjà été identifiés (Brigulla & Wackernagel, 2010). Ces questions de sécurité biologique sont au cœur de nombreux débats.

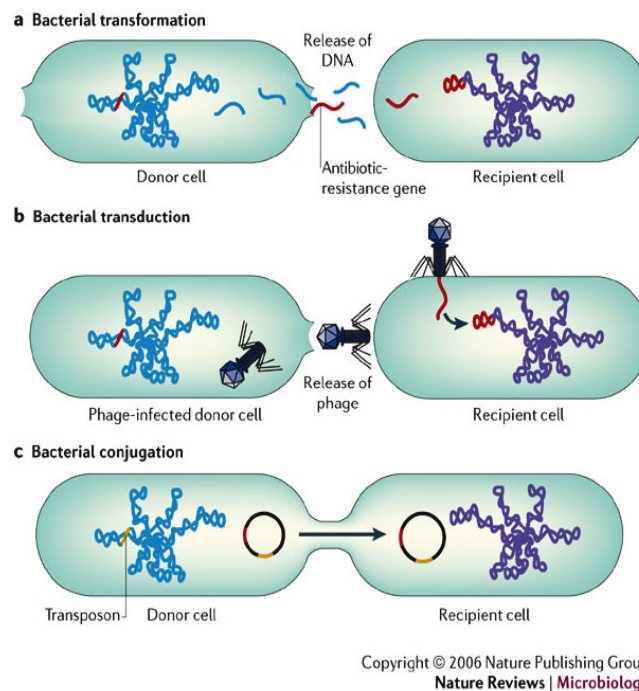


Figure 38 : Mécanismes de transfert horizontal de gènes chez les bactéries (Furuya & Lowy, 2006).

De l'ADN est internalisé par la cellule receveuse qu'il provienne d'ADN présent dans le milieu extracellulaire (a), d'un bactériophage (b) ou d'un plasmide conjugatif (c) puis peut être intégré dans le génome de la cellule receveuse.

L'intégration d'ADN exogène n'est pas toujours bénéfique pour la cellule, certains organismes ont développé des mécanismes de défense face à l'invasion d'ADN étranger. Parmi ceux-ci, on peut citer :

_ les systèmes de restriction/modification qui permettent de détecter et de dégrader un ADN qui ne possède pas les mêmes modifications (souvent des méthylations) que l'ADN de la cellule hôte (pour revue : (Mruk & Kobayashi, 2014); (Kobayashi, 2001)).

_ la nécessité de contenir une séquence spécifique DUS (DNA Uptake Sequence) pour que l'ADN soit internalisé dans la cellule hôte chez certaines bactéries (pour revue : (Mell & Redfield, 2014))

_ le système CRISPR-CAS dont le rôle est de permettre l'adaptation et une mémoire immunitaire de la bactérie face à des bactériophages ou des plasmides déjà rencontrés. De l'ADN de bactériophage est stocké dans la cellule à des locus spécifiques CRISPR. Lors d'une nouvelle infection, la transcription de ces régions d'ADN permet la synthèse d'un ARN non codant qui sera dirigé avec l'aide des protéines CAS contre l'ADN du bactériophage ce qui entraînera sa dégradation (pour revue : (Marraffini & Sontheimer, 2010); (Horvath & Barrangou, 2010), (Barrangou, 2015)).

_ les systèmes toxines/antitoxines, souvent sous forme d'éléments mobiles, ne permettant la survie que des organismes exprimant l'antitoxine et donc la propagation de l'élément mobile lui-même (pour revue : (Goeders & Van Melderen, 2014, Brantl & Jahn, 2015, Wen *et al.*, 2014)).

Il existe donc une balance entre des mécanismes permettant l'échange d'ADN et des mécanismes permettant de s'en protéger ce qui contribue à un contrôle des événements de transferts horizontaux.

C'est grâce à la compréhension de ces mécanismes de transfert d'ADN que de nombreux outils génétiques ont pu être mis au point afin de pouvoir manipuler les génomes et d'étudier les processus biologiques. Parmi ces mécanismes, la transformation est très utilisée soit de manière artificielle en traitant les cellules pour fragiliser leur(s) paroi(s) afin de permettre l'internalisation de l'ADN soit en jouant sur les capacités naturelles de transformation de l'espèce. *D. radiodurans* est naturellement transformable par de l'ADN chromosomique, linéaire ou plasmidique ce qui en fait un organisme facile à manipuler génétiquement.

La transformation naturelle est possible si l'espèce est compétente c'est-à-dire ayant la capacité à internaliser de l'ADN du milieu extérieur vers le cytoplasme. Certaines espèces le sont de manière constitutive comme *H. pylori*, *Thermus thermophilus* ou *D. radiodurans*. D'autres nécessitent un état

physiologique particulier sur une fenêtre de temps donnée comme *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. Ce phénomène nécessite des machineries transmembranaires afin de permettre le transport actif de l'ADN sous forme simple brin. Cette étape sera plus ou moins difficile selon qu'il s'agisse d'une bactérie Gram positive ou Gram négative. Une fois l'ADN simple brin internalisé, il est pris en charge par des protéines pour le protéger et pour l'intégrer par recombinaison dans le génome de la cellule hôte.

Beaucoup d'études ont été faites afin de comprendre ces mécanismes chez *S. pneumoniae*, *H. pylori*, *B. subtilis* ou encore *Neisseria gonorrhoeae* mais aucune n'a été faite chez *D. radiodurans*. Une description plus approfondie des mécanismes de transformation chez ces bactéries modèles ainsi qu'une étude chez *D. radiodurans*, font l'objet du chapitre 2 de cette thèse.

3. La recombinaison entre séquences répétées

Les régions comprenant des séquences répétées, qu'il s'agisse de répétitions d'un ou quelques nucléotides ou de longues régions d'ADN répétées sont source d'instabilité génétique en provoquant la duplication ou la délétion de régions allant de quelques pb à plusieurs kilobases. Des mécanismes de recombinaison RecA-dépendants et des mécanismes RecA-indépendants sont impliqués dans la génération de cette instabilité. La fréquence et la nature de ces événements diffèrent selon la nature des régions répétées, leur longueur, la distance qui les sépare, si elles sont directement répétées ou plus éloignées les unes des autres, en répétition directe ou inversée et si elles se situent ou non sur la même molécule d'ADN.

Il existe plusieurs types de séquences répétées :

Des répétitions de triplets de nucléotides de type CTG ou CAG répétés n fois. Ils sont hautement mutagènes car le nombre de ces répétitions peut être facilement modifié lors de la réplication ou de la réparation de cassures de l'ADN. L'amplification de certaines séquences répétées est connue pour être source de maladies neurodégénératives chez l'Homme comme la maladie de Steinert (dystrophie myotonique), le syndrome de l'X fragile (retard mental) ou encore la chorée de Huntington (Tsuji, 1997, Chastain & Sinden, 1998). Ces maladies sont liées à la tendance de longues séries de triplets à s'allonger au cours de la transmission du patrimoine génétique entre générations. Le nombre de triplets peut évoluer par des mécanismes liés à la réplication qui permettent d'ajouter ou d'enlever un petit nombre de triplet. L'amplification du nombre de triplets peut ainsi permettre d'atteindre un seuil au-delà duquel des expansions à plus grande échelle peuvent prendre place via

des mécanismes indépendants de la réplication (pour revue voir (Budworth & McMurray, 2013, Kuzminov, 2013)). Il a été établi que des répétitions CTG ou CAG peuvent, lorsqu'elles sont localisées dans un ADN simple brin, former des structures en pseudo-épingle à cheveux où les appariements CG peuvent stabiliser la structure qui contient des appariements non canoniques TT ou AA. L'orientation qui place les répétitions CTG dans le brin lagging est plus propice aux modifications du nombre de répétitions que l'orientation qui place les répétitions CAG dans le brin lagging.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer la formation des pseudo-épingle à cheveux au cours de la réplication (voir Figure 39) :

- (1) Le 1^{er} modèle implique le déplacement d'un brin néosynthétisé ayant pour matrice le brin lagging avant jonction entre des fragments d'Okazaki. La région simple brin déplacée peut alors former une pseudo-épingle à cheveux qui sera incorporée lors de la jonction des fragments d'Okazaki dans le brin néosynthétisé entraînant l'expansion des séquences répétées au cours du cycle de réplication suivant. L'endonucléase FEN1 limite l'expansion des CAG.CTG en éliminant le fragment d'ADN simple brin déplacé (Figure 39A).
- (2) Le 2^{ème} modèle implique la formation d'une pseudo-épingle à cheveux dans le brin matrice retardé entraînant une pause de la polymérase suivie de la réversion de la fourche de réplication avec une extension simple brin sur le brin leading néosynthétisé qui va conduire à la formation d'une pseudo-épingle à cheveux sur ce brin leading néosynthétisé, entraînant l'expansion des séquences répétées au cours du cycle de réplication suivant (Figure 39B).

Dans ces deux modèles, l'instabilité des séquences répétées dépendante de la réplication est liée à des événements qui se produisent initialement à la fourche de réplication au cours de la réplication du brin lagging.

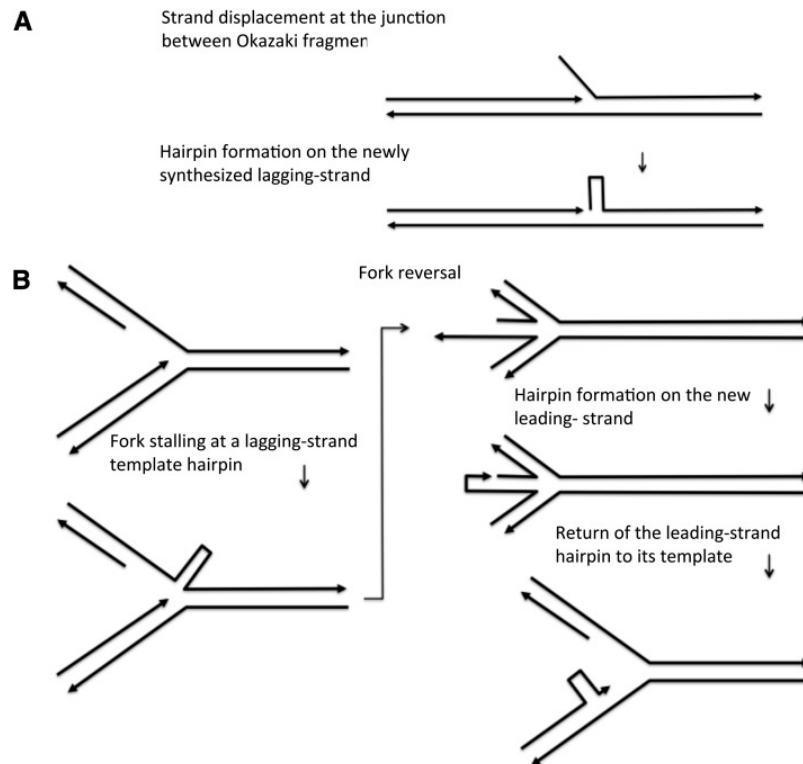


Figure 39 : Modèles pour l'expansion des trinuécléotides (d'après (Jackson *et al.*, 2014)).

(A) Modèle impliquant la formation d'une pseudo-épingle à cheveux au cours de la maturation des fragments d'Okazaki.

(B) Modèle impliquant la réversion de la fourche de réplication liée à une pause de la polymérase suite à la formation d'une pseudo-épingle à cheveux au niveau des séquences CAG.CTG dans le brin matrice du brin lagging

L'instabilité des séquences répétées CAG.CTG a également été mise en évidence chez la bactérie *E. coli* et de nombreuses études ont été réalisées pour mieux comprendre les mécanismes responsables de cette instabilité. Il a été montré que chez *E. coli*, l'expansion de ces séquences répétées se fait par un mécanisme indépendant de leur orientation alors que leur contraction est dépendante de leur orientation (Zahra *et al.*, 2007), les délétions étant plus fréquentes si les répétitions CTG sont localisées sur le brin lagging. Il a été proposé que la dépendance de l'orientation des contractions était liée à la présence d'ADN simple brin sur la matrice du brin lagging associée à la plus grande stabilité des pseudo-épingles à cheveux qui impliquent des séquences CTG favorisant ainsi le glissement de la polymérase au niveau de ces épingles à cheveux.

Chez *E. coli*, l'inactivation du gène *rep* ralentit la réplication et augmente l'instabilité des répétitions CAG.CTG (Jackson *et al.*, 2014). Un mutant *rep* se caractérise par ailleurs par le fait que les réversions de fourche sont dépendantes de RuvAB (Seigneur *et al.*, 1998, Baharoglu *et al.*, 2006). Dans le laboratoire de David Leach, Jackson *et al.* (2014) ont pu montrer que l'expansion des séquences CAT.CTG n'est pas réduite dans un double mutant *rep ruvA* suggérant que l'expansion des séquences

CAG.CTG chez un mutant *rep* n'est pas liée à un mécanisme de réversion de fourches. Ces auteurs ont également montré que l'absence des exonucléases 5'-3' simple brin RecJ ou 3'-5' simple brin ExoI augmente la fréquence des événements d'expansion des séquences répétées CAG.CTG, suggérant que les substrats qui vont permettre l'expansion de ces séquences sont des ADNs simple brin avec une extrémité 3' ou une extrémité 5' accessible à l'une ou l'autre de ces exonucléases (Jackson *et al.*, 2014). Des expériences complémentaires seront nécessaires pour comprendre les interactions des activités exonucléases de Poll, RecJ et ExoI dans la maturation des fragments d'Okazaki et le contrôle de l'expansion des répétitions CAG.CTG chez *E. coli*.

Les séquences répétées palindromiques : Ce sont de longues séquences symétriques séparées ou non par quelques nucléotides. Du fait de leur symétrie, les séquences palindromiques sont capables de former des appariements intramoléculaires engendrant des structures en épingle à cheveux ou des structures cruciformes (Leach, 1994, Davison & Leach, 1994) problématiques pour la progression des fourches de réplication et qui potentiellement sont source d'instabilité génomique (Lewis & Cote, 2006, Tanaka & Yao, 2009). Ces séquences palindromiques sont responsables de délétions ou d'amplifications de gènes, de fractures, de translocations chromosomiques à l'origine de maladies héréditaires ou de réarrangement dans des cellules cancéreuses chez l'homme (Lewis & Cote, 2006, Lobachev *et al.*, 2007, Tanaka *et al.*, 2006, Kurahashi *et al.*, 2006). Parmi les remaniements majeurs engendrés par la présence de séquences palindromiques, des duplications chromosomiques inversées, dans laquelle le palindrome est situé au centre du réarrangement ont été observées (Tanaka & Yao, 2009).

Trois hypothèses principales ont été proposées pour expliquer le rôle des palindromes dans la formation des duplications chromosomiques inversées (Figure 40).

- La structure cruciforme engendrée par la présence du palindrome est clivée au niveau de la jonction des brins d'ADN, cette coupure est ensuite prise en charge par une ligase et la ligature est suivie par la réplication de l'ADN (voir Figure 40A)
- Une cassure double brin est engendrée en aval du palindrome, ensuite la maturation des extrémités laisse la séquence palindromique dans une région d'ADN simple brin permettant l'appariement des séquences complémentaires suivi d'une ligature et de la réplication de l'ADN (voir Figure 40B)
- Chez *S. cerevisiae* des régions répétées inversées plus éloignées peuvent également induire la formation de duplications chromosomiques inversées. Une cassure en aval des séquences inversées puis la maturation des extrémités par une exonucléase laissent les séquences répétées inversées dans une région d'ADN simple brin. Ces molécules portant une extrémité

simple brin vont ensuite pouvoir s'apparier au niveau des séquences répétées par un mécanisme de type SSA engendrant la formation d'une duplication chromosomique inversée (Figure 40C).

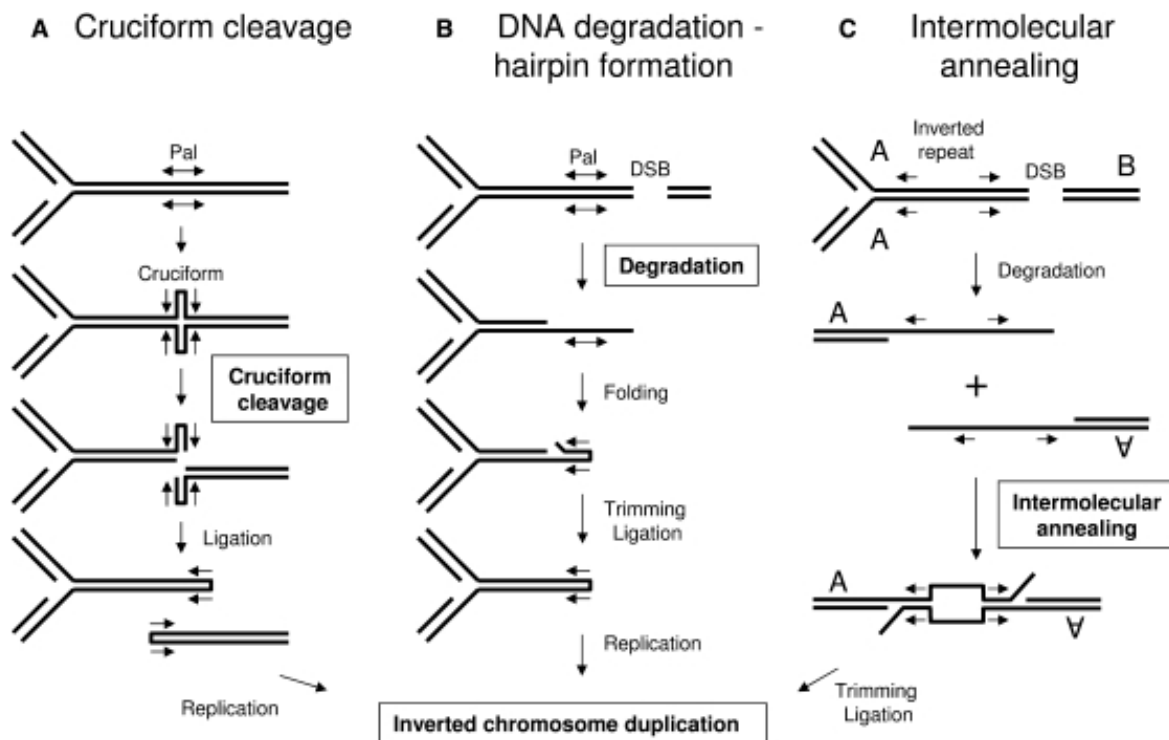


Figure 40 : Principales hypothèses concernant la formation de duplications chromosomiques inversées liées à la présence de séquences palindromiques ou de séquences répétées inversées dans le chromosome (Darmon *et al.*, 2010).

Chez la bactérie *E. coli*, une séquence palindromique de 246 pb forme une épingle à cheveux dans la matrice du brin lagging à chaque cycle de réplication (Eykelboom *et al.*, 2008). Le complexe SbcCD clive alors l'ADN au pied de l'épingle à cheveux laissant une cassure double brin. Pour que les cellules survivent, la cassure double brin est réparée par recombinaison homologue de façon RecBCD et RecA dépendante n'engendrant pas de duplications chromosomiques inversées. Il a été proposé que chez *E. coli*, les protéines SbcCD et RecA protègent l'intégrité du génome en présence de séquences palindromiques (Darmon *et al.*, 2010). L'induction de cassures double brin en aval du palindrome entraîne l'augmentation du nombre de structures en épingle à cheveux chez des mutants *recA sbcCD* sans augmenter la formation de duplications chromosomiques inversées. De la même façon, chez la levure *S. cerevisiae*, le complexe Rad50-Mre11, homologue du complexe SbcCD, prévient la formation de duplications chromosomiques inversées et l'absence de Rad51, protéine homologue à

RecA, stimule chez *Schizosaccharomyces pombe*, stimule la formation de ces duplications chromosomiques inversées (Nakamura *et al.*, 2008).

Chez *E. coli*, en absence de SbcCD et de RecA, il a été montré que la présence d'une séquence palindromique induisait la formation de duplications chromosomiques inversées centrées au niveau du palindrome (Darmon *et al.*, 2010). Il est proposé que dans ce contexte génétique, la formation des duplications chromosomiques inversées ne dépendent pas du clivage de structures cruciformes, aucune réduction dans la formation de ces duplications n'étant observée chez les mutants *ruv* et/ou *recG*. Par contre la formation des structures en épingles à cheveux et des duplications chromosomiques inversées est totalement abolie dans un mutant *recB* et réduite chez un mutant *recD* affecté dans l'activité nucléase du complexe RecBCD. Une réduction de cette formation est également observée dans un mutant déficient pour SbcB (ExoI). Ces résultats suggèrent que la dégradation de l'ADN contribue à la formation des duplications chromosomiques inversées.

Les séquences répétées directes : la présence de séquences répétées directes est également source d'instabilité génétique. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués selon les caractéristiques de ces séquences (taille, distance de séparation, répartition spatiale) et font l'objet de l'introduction du chapitre 1 de cette thèse.

V. Objectifs de cette thèse

Le génome de la souche BAA-816 de *D. radiodurans* comporte 52 IS qui peuvent pour certains être présents en plusieurs copies, 295 régions répétées non codantes (Small non coding repeats, SNR) retrouvées dans les régions intergéniques ayant des tailles allant de 60 à 215 pb (Makarova *et al.*, 1999, White *et al.*, 1999, Makarova *et al.*, 2001). La présence de régions répétées est un véritable challenge lorsque les cellules sont exposées à de fortes doses d'irradiation. En effet, ces séquences répétées pourraient être source d'importants remaniements chromosomiques lors de la reconstitution du génome à partir de centaines de fragments engendrés par l'irradiation. Il semble pourtant que peu de réarrangements chromosomiques majeurs soient observés chez *D. radiodurans* si on écarte ce qui est observé chez les quelques survivants exposés à des doses extrêmes de 25 kGy de radiations ionisantes ou les remaniements importants observés par électrophorèse en champ pulsé au cours de la réparation des cassures de l'ADN chez des cellules dépourvues de RecA (Repar *et al.*, 2010) suggérant que des mécanismes de réparation des cassures de l'ADN RecA-indépendants pourraient être source d'instabilité génétique.

Je me suis donc intéressée à l'étude de délétions engendrées par la présence de séquences répétées dans le génome de *D. radiodurans* et j'ai mesuré la fréquence de ces délétions en fonction du contexte génétique pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu dans l'instabilité génétique chez *D. radiodurans* (Résultats, Chapitre I).

Je me suis également intéressée aux protéines impliquées chez *D. radiodurans* dans la transformation, une autre source de variabilité génétique (Résultats, Chapitre 2).

J'ai également participé au cours de ma thèse à l'étude de la régulation de la réponse aux radiations. Ces résultats ont été présentés dans l'introduction de cette thèse (paragraphe II.3.C, page 30) et la publication correspondante est ajoutée en annexe de ce manuscrit de thèse.

Chapitre 1

**Les mécanismes
d'instabilité génétique
entre séquences répétées
directes chez
D. radiodurans : rôle majeur
de l'appariement simple
brin dans la recombinaison
RecA-indépendante entre
séquences répétées**

I. Introduction

1. La taille des séquences répétées et des régions espaceurs influence la recombinaison entre séquences répétées

La recombinaison entre séquences répétées est source de délétions ou de duplications. Les mécanismes à l'origine de ces remaniements chez les bactéries ont fait l'objet de nombreux travaux qui montrent que plusieurs mécanismes peuvent engendrer de l'instabilité au niveau de séquences répétées. Des études réalisées chez les bactéries sont présentées dans le Tableau 3. On regroupe les évènements de recombinaison entre les séquences répétées dans deux catégories : les évènements RecA-dépendants et les évènements RecA-indépendants. La majorité des études réalisées chez *B. subtilis*, *H. pylori* et *E. coli* ont été faites sur la recombinaison intra ou intermoléculaire entre des séquences répétées localisées sur des plasmides avec des tailles de répétition et des espacements variables entre les séquences (Tableau 3). On remarque que deux facteurs influencent la fréquence des évènements de recombinaison : la taille des séquences répétées et la distance qui les sépare. De manière générale, la fréquence de recombinaison entre ces séquences répétées augmente avec la taille de ces séquences et est en général indépendante de RecA pour des tailles inférieures à 100 pb. La part de recombinaison dépendante de RecA augmente pour des répétitions de plus grande taille (supérieure à 300 pb) et représente la majorité des évènements si les régions répétées sont éloignées de quelques milliers de paires de base (Tableau 3). Peu d'expériences ont été réalisées avec des substrats localisés sur le chromosome. Une indépendance totale ou partielle de RecA a pu être mise en évidence pour des répétitions en tandem (taille de l'espaceur 0) (Bierne *et al.*, 1997, Lovett *et al.*, 1993, Saveson & Lovett, 1997) (Tableau 3). Chez *H. pylori*, la fréquence de délétions entre des séquences répétées de 358 pb séparées par une région espaceur de 850 pb, s'est révélée dépendante à 90% de la protéine RecA (Marsin *et al.*, 2008).

Recombinaison intra et interplasmidique

organismes	taille des répétitions directes (pb)	taille espaceur (pb)	fréquence de délétion dans une souche wt	dépendance de RecA	références
<i>B. subtilis</i>	18	33	10 ⁻⁵	non	(Chedin <i>et al.</i> , 1997)
		79	10 ⁻⁶		
		144-304	10 ⁻⁷		
		704-1303	10 ⁻⁸		
<i>H. pylori</i>	100	1000	10 ⁻⁶	non	(Aras <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. coli</i>	165	44	10 ⁻⁵	dépendant de RecA à 90%	(Dianov <i>et al.</i> , 1991)
	401	68	10 ⁻⁴	non	(Mazin <i>et al.</i> , 1991)
	42	52	10 ⁻⁶		
	21	40	10 ⁻⁸		
	13	56	10 ⁻¹¹		
	787	0	10 ⁻⁴	dépendant de RecA à 70%	(Lovett <i>et al.</i> , 1993, Saveson & Lovett, 1997)
	101	21	10 ⁻⁴	non	(Lovett & Feschenko, 1996)
	101	100	10 ⁻⁵	non	(Lovett <i>et al.</i> , 1994)
	101	260 à 2900	10 ⁻⁶		
	101	3200 à 7100	10 ⁻⁷		
	30	0	10 ⁻⁵	non	(Bi & Liu, 1994)
	300	0	10 ⁻⁴	non	
	856	0	10 ⁻⁴	dépendant de RecA à 80%	
	30	3872	10 ⁻⁷	non	
	300	3872	10 ⁻⁴	oui	
	856	3872	10 ⁻³	oui	
	559	0	10 ⁻⁴	non	
	559	100	10 ⁻⁴	non	
	559	398	10 ⁻⁴	dépendant de RecA à 80%	
	559	2668	10 ⁻³	oui	
559	3872	10 ⁻³	oui		

Recombinaison intra et interchromosomique

<i>B. subtilis</i>	513	0	10 ⁻⁴	non	(Bruand <i>et al.</i> , 2001)
<i>H. pylori</i>	358	1000	10 ⁻⁵	dépendant de RecA à 90%	(Marsin <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i>	787	0	10 ⁻⁵	dépendant de RecA à 70%	(Lovett <i>et al.</i> , 1993, Saveson & Lovett, 1997)
	624	0	10 ⁻⁴	non	(Bierne <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 3: Fréquence de recombinaison entre deux séquences répétées chez différents organismes.

2. Les mécanismes à l'origine d'instabilité génétique entre les séquences répétées

Si un décalage se produit lors de l'appariement homologue entre séquences répétées, des délétions ou des amplifications de séquences seront engendrées.

Ces évènements peuvent se produire lors de la recombinaison homologue RecA-dépendante entre des séquences répétées portées par deux molécules d'ADN différentes ou portées par la même molécule d'ADN (Figure 41). Cette recombinaison peut être stimulée par la présence de cassures double brin de l'ADN dans une des répétitions ou entre les répétitions.

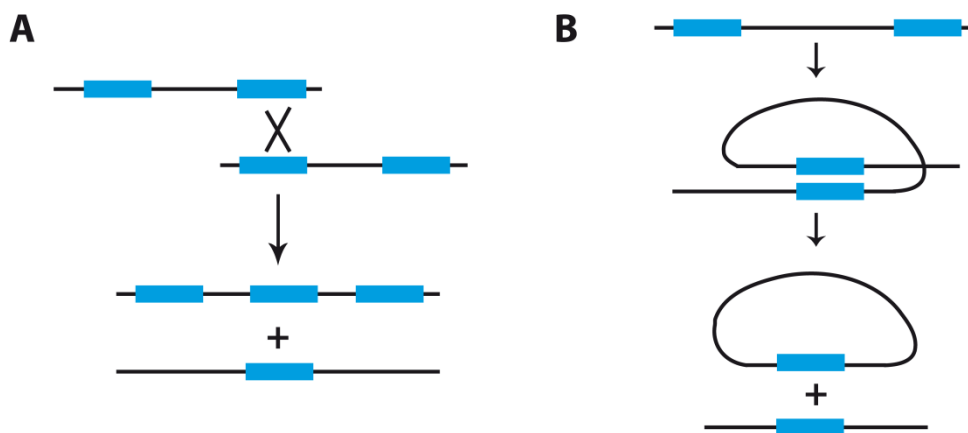


Figure 41 : Modèle de délétion ou d'amplification de séquences répétées par recombinaison homologue.

(A) recombinaison interchromosomique entre des séquences répétées localisées sur des molécules d'ADN différentes (d'après Bzymek *et al.*, 1999)

(B) recombinaison intra-chromosomique entre des séquences répétées localisées sur la même molécule d'ADN (d'après Lovett, 1994).

Si des cassures de l'ADN se produisent dans ou entre les séquences répétées, la réparation de ces cassures peut également se faire par SSA, une autre voie qui permet d'engendrer des remaniements dans les régions qui portent les séquences répétées (Figure 42).

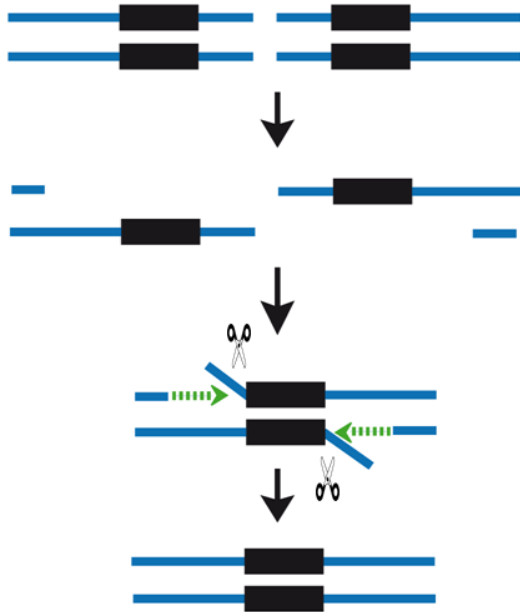


Figure 42 : Schématisation des évènements de Single Strand Annealing (SSA)

Un blocage ou une pause de la fourche de réplication dans une région contenant des répétitions peut favoriser des glissements de polymérase (Figure 43).

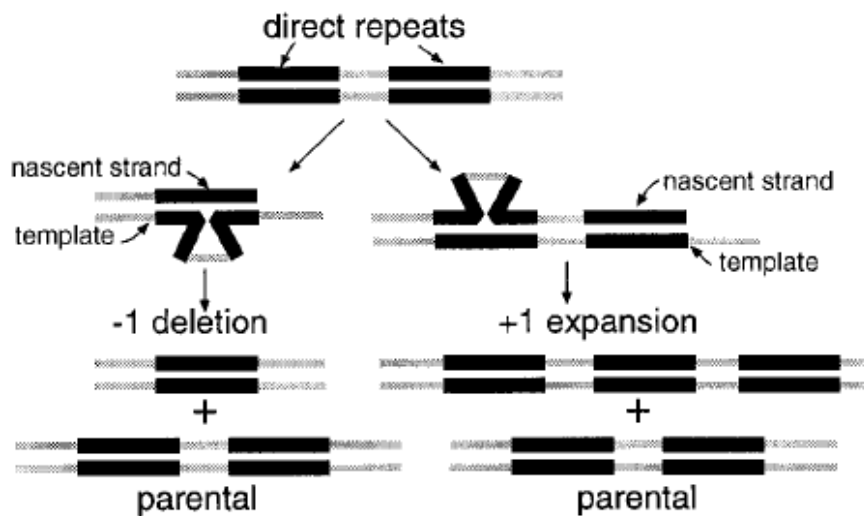


Figure 43 : Glissements de polymérase pouvant se produire au niveau de séquences répétées (Bzymek & Lovett, 2001).

Un glissement de polymérase lors de la réplication peut provoquer des délétions (à gauche) ou des amplifications des séquences répétées (à droite).

Comme il a été décrit dans l'introduction (paragraphe III.3 page 66), il existe plusieurs mécanismes de maintien ou de reprise de fourche de réplication dépendants de l'envahissement d'une molécule homologue. Ceci peut se produire si des discontinuités simple brin sont engendrées lorsque la réplication est bloquée par une lésion encombrante sur l'ADN matrice (Figure 29 page 67) ou si une cassure est présente sur un brin matrice (Figure 44a et 33 page 69). La réparation de ces discontinuités peut se faire en impliquant des appariements décalés entre les régions répétées lors de l'étape d'envahissement homologue. C'est un décalage de l'appariement au niveau des régions répétées qui provoque de l'instabilité génétique.

D'autre part, lors de la régression de la fourche de réplication et des étapes qui vont ensuite permettre le redémarrage de la réplication, un décalage peut également s'effectuer lors de l'appariement des deux brins néo-synthétisés (étape de régression) ou ensuite dans l'étape d'envahissement de la molécule homologue (Figure 44b et Figure 34 page 71)

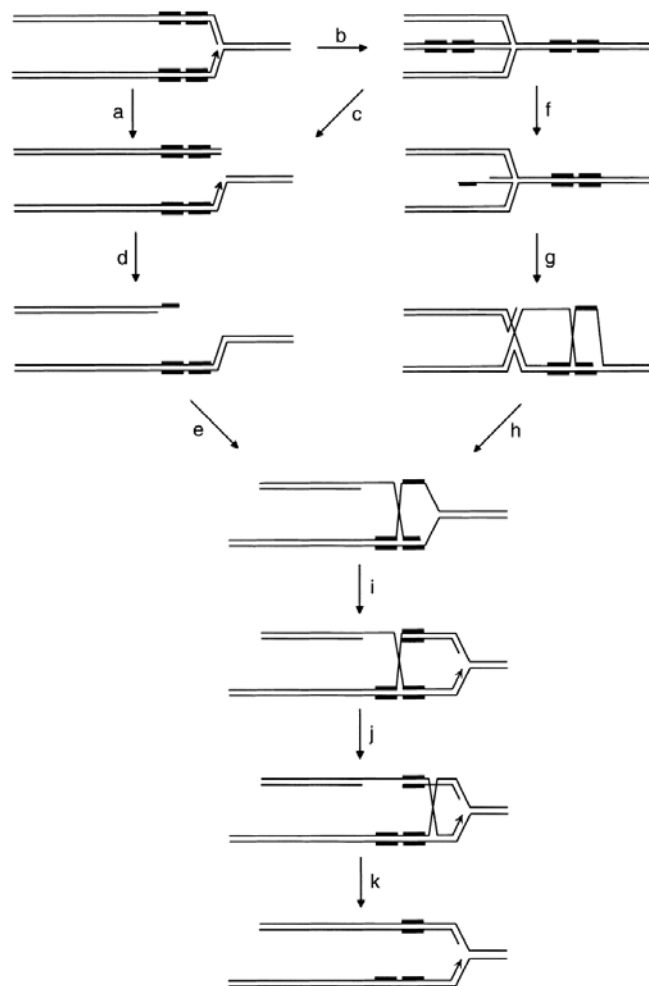


Figure 44 : Modèles de délétion au niveau de séquences répétées lors de blocage de fourche (Bruand *et al.*, 2001)

Le blocage des fourches peut engendrer des cassures double brin directes (a) ou après réversion de fourche (b). Après maturation des extrémités double brins (d, f), la réparation par recombinaison homologue est initiée (e, g). Un décalage de l'appariement lors de l'envahissement de la molécule homologue par RecA (e, g) pour réparer des cassures peut conduire à la délétion d'une séquence répétée (k).

La réparation de cassures de l'ADN au niveau d'une fourche de réplication par un mécanisme de type SSA peut également être à l'origine d'instabilité génétique si la cassure s'est produite entre les séquences répétées (Figure 45). Ce modèle a été proposé par Bénédicte Michel lors de l'étude de blocage de fourche au niveau d'un site Ter.

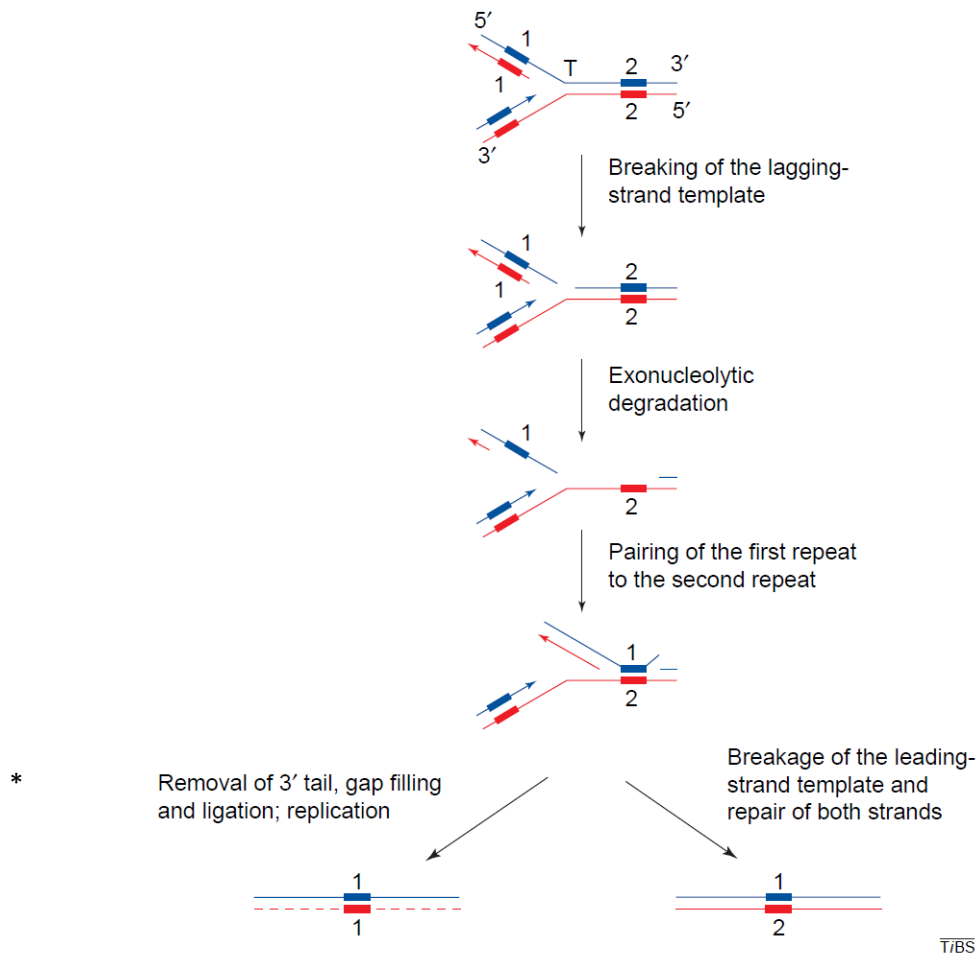


Figure 45 : Modèle de délétion entre séquences répétées par Single Strand Annealing (Michel, 2000).

Une cassure au niveau du brin retardé entraîne une cassure double brin au niveau de la fourche de réplication. La dégradation des extrémités 5' génère des extrémités 3' simple brin contenant les séquences répétées. Un appariement avec décalage entre les régions répétées 1 et 2 génère une structure intermédiaire pouvant être résolue de deux façons : (en bas à gauche) les régions flottantes sont clivées, la brèche comblée et les molécules refermées par ligation. La molécule d'ADN intermédiaire possède alors un brin porteur d'une seule région répétée et un brin porteur des deux régions répétées, puis un cycle de réplication produit une molécule d'ADNdb portant une délétion. (En bas à droite) : les deux brins de la structure intermédiaire sont réparés par ligation donnant directement la molécule avec des délétions. (Ligne continue : ADN matrice, ligne en pointillé : ADN néosynthétisé, T : site Ter).

3. Stratégie d'étude de l'instabilité génétique entre séquences répétées chez *D. radiodurans*

Des études sur la recombinaison entre séquences répétées chez *D. radiodurans* ont été faites dans les années 90 (Daly *et al.*, 1994a, Daly & Minton, 1995, Daly & Minton, 1996).

Ces auteurs ont mis au point un système génétique (Figure 46) permettant d'étudier la recombinaison interplasmidique entre séquences répétées chez *D. radiodurans*. Deux plasmides ont été utilisés, chacun portant une copie d'un gène *tet* de 1370 pb. Chaque copie *tet* possède une région mutée de 8 pb introduisant un site de restriction XhoI mais localisée à des positions différentes dans le gène *tet* (929 pb entre les positions des sites de restriction introduits dans la carte d'un gène *tet*). Chacune de ces mutations rend le gène *tet* correspondant non fonctionnel. L'introduction de ces mutations dans deux copies distinctes du gène *tet* situées sur 2 plasmides différents ayant chacun des séquences différentes flanquant le gène *tet* permet une analyse par Southern Blot de la structure de cette région. La taille des fragments visualisés en utilisant différentes sondes permet d'analyser finement les réarrangements qui ont eu lieu (conversion génique, simple ou double crossing-over) dans la population totale ou dans les cellules devenues résistantes à la tétracycline. Les événements de recombinaison après exposition à une dose de 17,5 kGy ont été analysés et résultent pour la majorité d'un seul crossing-over entre les régions *tet* localisées sur les 2 plasmides. La résistance à la tétracycline résulte majoritairement d'un seul crossing-over au niveau des régions *tet* qui s'est produit dans la région localisée entre les deux sites de mutations XhoI. Tous les événements de recombinaison observés sont dépendants de la protéine RecA (Daly *et al.*, 1994a).

Une deuxième étude des mêmes auteurs s'est intéressée à la recombinaison intra- ou interchromosomique. Dans ce but, le même type de substrat a été intégré dans l'ADN génomique de *D. radiodurans*. La première stratégie visait à créer une souche hétérozygote contenant deux chromosomes homologues avec chacun un des deux allèles *tet* et une cassette de sélection différente. Elle n'a pas permis d'étudier de recombinaison inter-chromosomique du fait d'une perte de viabilité des souches en culture avec une double pression de sélection. La deuxième stratégie consistait à insérer les copies *tet* et leurs régions flanquantes dans deux locus chromosomiques différents distants de 23 kpb. Les résultats montrent que ce type de recombinaison, majoritairement due à un double crossing-over, n'est observée qu'après exposition à des doses élevées de radiations (17,5 kGy) et dans des souches *recA*⁺ (Minton & Daly, 1995). Le niveau basal de recombinaison est probablement trop faible pour être détecté par les techniques employées par Daly et Minton.

Un travail similaire a également permis de mettre en évidence des événements de recombinaison RecA-dépendants entre chromosome et plasmide après irradiation (Daly & Minton, 1997).

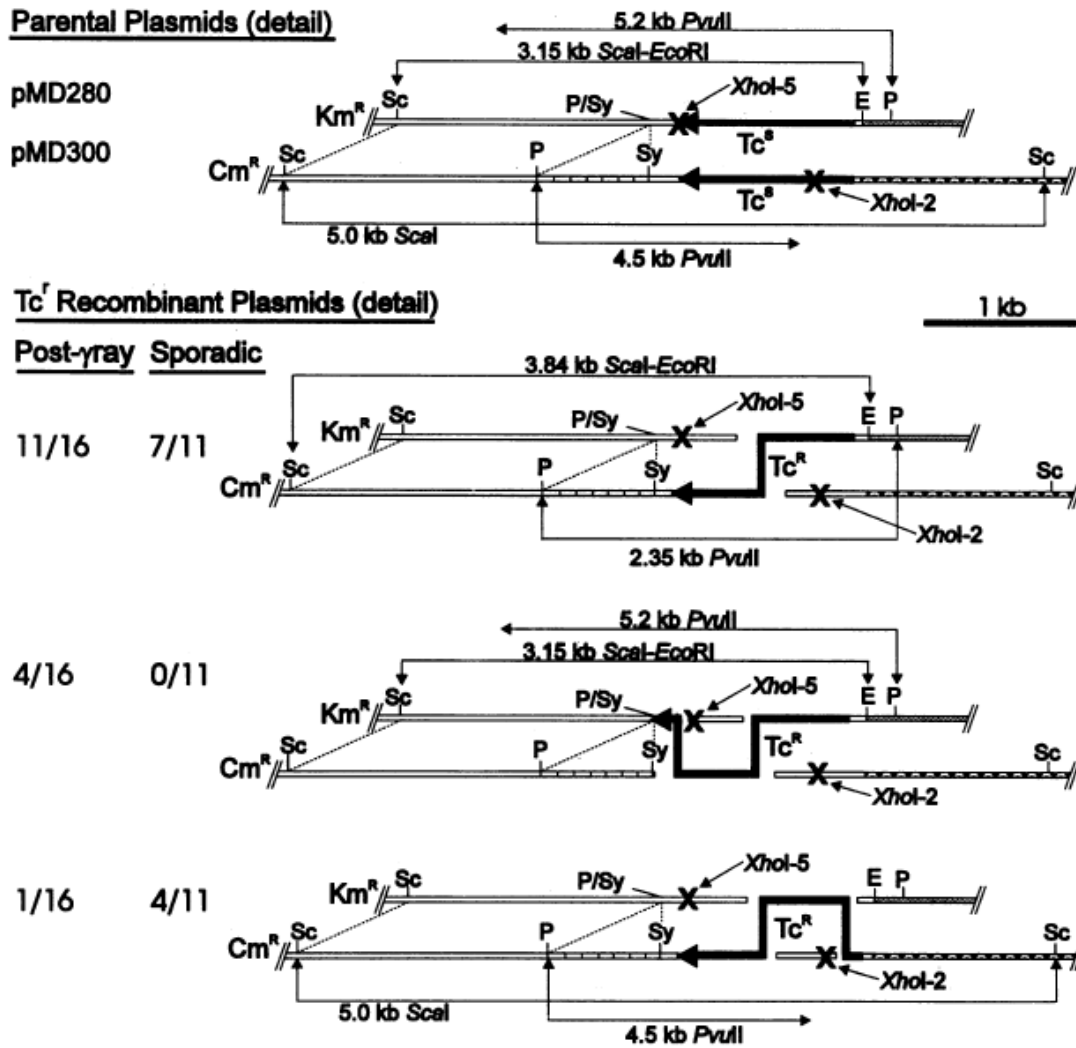


Figure 46 : Schéma du système génétique utilisé pour étudier la recombinaison interplasmidique par (Daly *et al.*, 1994a).

Les deux plasmides pMD280 et pMD300 contenant chacun une copie d'un gène *tet* mutée et non fonctionnelle sont introduits dans la même souche. Le schéma des événements aboutissant à la formation de bactéries résistantes à la tétracycline (Tc^R) ainsi que leur fréquence sont illustrés. En premier, les simples crossing over, mécanisme majoritaire, en dessous, les événements de conversion génique ou de double crossing over. Les sites XhoI-5 et XhoI-2 sont les sites mutés dans les gènes *tet*.

Un autre système, permettant l'introduction de régions répétées adjacentes via l'intégration de deux plasmides dans le chromosome et permettant leur excision et re-circularisation a montré que des évènements d'excision d'un plasmide sont observés 1,5h après irradiation dans un contexte $\Delta recA$. Les auteurs ont proposé qu'un mécanisme de type SSA soit mis en place immédiatement après irradiation et soit une étape préparatoire à une réparation globale du génome dans des cellules sauvages (Daly & Minton, 1996), une hypothèse reprise plus tard par Slade et al (Slade *et al.*, 2009) et étayée par les résultats publiés dans (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) qui montrent le rôle de la protéine DdrB, connue pour son activité dans le SSA, dans un mécanisme précoce de réparation des cassures double brin de l'ADN.

Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'évènements de recombinaison induits par exposition à des doses élevées d'irradiation chez *D. radiodurans*. Cependant, les analyses des évènements sont effectuées soit sur l'ADN total d'une population γ compris des cellules mortes exposées au rayonnement γ , soit sur l'ADN de sous populations devenues résistantes à la tétracycline ayant survécu soit à des doses très élevées d'irradiation (17,5 kGy), générant un grand nombre de cassures de l'ADN, soit en absence de RecA avec plus de 90 % de mortalité dans la population. Ce sont des conditions très éloignées des conditions physiologiques qui ne permettent pas de conclure sur les évènements pouvant se produire lors du métabolisme de l'ADN dans un cycle cellulaire normal. Nous avons donc choisi d'étudier la recombinaison « spontanée » entre séquences répétées. Pour cela, nous avons utilisé un système voisin de celui utilisé par Stéphanie Marsin (Marsin *et al.*, 2008) chez *H. pylori*, un organisme ayant une forte instabilité génétique (Aras *et al.*, 2003). Les travaux sur *H. pylori* ont montré que la recombinaison spontanée entre des séquences répétées de 358 pb séparées par une région de 850 pb était dépendante à 90 % de la recombinase RecA.

Notre système comporte deux régions 5' et 3' d'un gène *tetA* non fonctionnelles séparées de 1479 pb et partageant une région de 438 pb. La recombinaison entre les séquences répétées conduit à la formation d'un gène *tetA* fonctionnel ce qui confère aux bactéries la résistance à la tétracycline (Figure 47).

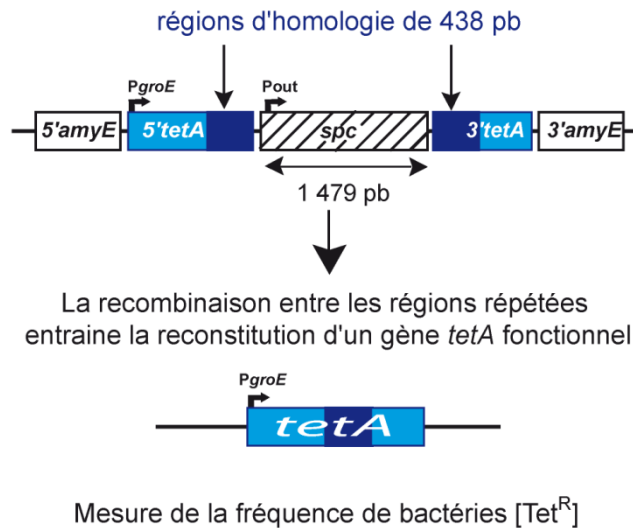


Figure 47 : Schéma de l'outil génétique utilisé pour mesurer la recombinaison inter ou intrachromosomique entre séquences répétées chez *D. radiodurans*

La fréquence des bactéries résistantes à la tétracycline a été mesurée dans différents contextes génétiques afin d'étudier par quels mécanismes, de l'instabilité génétique entre des séquences répétées peut être observée chez *D. radiodurans* de manière spontanée ainsi qu'après irradiation. Ces travaux ont permis de montrer que le SSA joue un rôle majeur dans la recombinaison entre séquences répétées en absence de RecA, mais également dans un contexte *recA*⁺ si les souches sont exposées à une dose de 5 kGy de rayonnement ionisant.

Les résultats de cette étude viennent d'être soumis pour publication et sont présentés dans la partie Résultats de ce chapitre.

II. Résultats

Single Strand Annealing Plays a Major Role in RecA-independent Recombination between Repeated Sequences in the Radioresistant *Deinococcus radiodurans* Bacterium

Solenne Ithurbide, Esma Bentchikou¹, Geneviève Coste, Bruno Bost, Pascale Servant² and Suzanne Sommer^{*,2}

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris Sud, Bâtiment 409, 91405 Orsay, France

¹ Present address: *Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris Sud, Bâtiment 26, Avenue de la Terrasse, 91998 Gif sur Yvette, France*

* Corresponding author

² Co-senior authors

Key words: *Deinococcus radiodurans*, Single strand annealing, DdrB protein, Recombination between repeated sequences, IS200/IS605 family, Okazaki fragments, replication fork, genome instability

Short title: DNA repeat promoted deletions in *D. radiodurans*

Version révisée soumise pour publication dans PLoS Genetics le 2 Octobre 2015

26 **Abstract**

27

28 The bacterium *Deinococcus radiodurans* is one of the most radioresistant organisms known.
29 It is able to reconstruct a functional genome from hundreds of radiation-induced chromosomal
30 fragments. Our work aims to highlight the genes involved in recombination between 438 bp
31 direct repeats separated by intervening sequences of various lengths ranging from 1,479 bp to
32 10,500 bp to restore a functional *tetA* gene in the presence or absence of radiation-induced
33 DNA double strand breaks. The frequency of spontaneous deletion events between the
34 chromosomal direct repeats were the same in *recA*⁺ and in $\Delta recA$, $\Delta recF$, and $\Delta recO$ bacteria,
35 whereas recombination between chromosomal and plasmid DNA was shown to be strictly
36 dependent on the RecA and RecF proteins. The presence of mutations in one of the repeated
37 sequence reduced, in a MutS-dependent manner, the frequency of the deletion events. The
38 distance between the repeats did not influence the frequencies of deletion events in *recA*⁺ as
39 well in $\Delta recA$ bacteria. The absence of the UvrD protein stimulated the recombination
40 between the direct repeats whereas the absence of the DdrB protein, previously shown to be
41 involved in DNA double strand break repair through a single strand annealing (SSA)
42 pathway, strongly reduces the frequency of RecA- (and RecO-) independent deletions events.
43 The absence of the DdrB protein also increased the lethal sectoring of cells devoid of RecA or
44 RecO protein. γ -irradiation of *recA*⁺ cells increased about 10-fold the frequencies of the
45 deletion events, but at a lesser extend in cells devoid of the DdrB protein. Altogether, our
46 results suggest a major role of single strand annealing in DNA repeat deletion events in
47 bacteria devoid of the RecA protein, and also in *recA*⁺ bacteria exposed to ionizing radiation.

48

49 **Author Summary**

50

51 *Deinococcus radiodurans* is known for its exceptional ability to tolerate exposure to DNA
52 damaging agents and, in particular, to very high doses of ionizing radiation. This exceptional
53 radioresistance results from many features including efficient DNA double strand break
54 repair. Here, we examine genome stability in *D. radiodurans* before and after exposure to
55 ionizing radiation. Rearrangements between repeated sequences are a major source of genome
56 instability and can be deleterious to the organism. Thus, we measured the frequency of
57 recombination between direct repeats separated by intervening sequences of various lengths in
58 the presence or absence of radiation-induced DNA double strand breaks. Strikingly, we
59 showed that the frequency of deletions was as high in strains devoid of the RecA, RecF or
60 RecO proteins as in wild type bacteria, suggesting a very efficient RecA-independent process
61 able to generate genome rearrangements. Our results suggest that single strand annealing may
62 play a major role in genome instability in the absence of homologous recombination.

63

64 **Introduction**

65

66 The extreme resistance of the bacterium *D. radiodurans* to DNA-fragmenting
67 treatments, such as ionizing radiation or desiccation, is correlated with the ability to
68 reconstruct a functional genome from hundreds of chromosomal fragments. The rapid
69 reconstitution of an intact genome is thought to occur through an extended synthesis-
70 dependent strand annealing process (ESDSA) followed by DNA recombination [1,2]. During
71 ESDSA, chromosomal fragments with overlapping regions are used both as primers and
72 templates for a massive synthesis of single-stranded DNA extensions. Newly synthesized
73 complementary single stranded DNA extensions appear to anneal so that contiguous DNA
74 fragments are joined together forming long linear intermediates. These intermediates require
75 RecA-dependent homologous recombination to mature into reconstituted circular
76 chromosomes representing DNA patchworks of numerous double-stranded DNA blocks
77 synthesized before irradiation connected by DNA blocks synthesized after irradiation.

78 We have recently shown that the Deinococcal RecF, RecO, RecR proteins, by their
79 ability to load RecA onto its single-stranded DNA substrate, play a crucial role in DNA
80 double strand break repair via ESDSA and recombinational repair pathways [3]. Mutant
81 $\Delta uvrD$ bacteria showed a markedly decreased radioresistance, an increased latent period in the
82 kinetics of DNA double strand break repair and a slow rate of fragment assembly correlated
83 with a slow rate of DNA synthesis, suggesting that UvrD helicase might be involved in the
84 processing of double stranded DNA ends and/or in the DNA synthesis step of ESDSA [3].

85 More recently, it was proposed that a single strand annealing (SSA) process
86 participates in an early step of DNA double strand break repair by facilitating the accurate
87 assembly of small fragments to generate suitable substrates for subsequent ESDSA-promoted
88 genome reconstitution [4]. The DdrB protein was previously shown to exhibit *in vitro*
89 properties akin to those of SSB protein [5] but also to promote annealing of single stranded

90 DNA [6]. The DdrB protein, recruited early after irradiation into the nucleoid, was also shown
91 to be involved in the slow DNA double strand break repair observed in cells devoid of the
92 RecA protein, and thus to play a major role in RecA-independent DNA double strand break
93 repair through SSA [4,6].

94 Rearrangements between repeated sequences are a major source of genome instability
95 and can be deleterious to the organism. These rearrangements can result in deletion or
96 duplication of genetic material flanked by direct repeats. In *Escherichia coli*, recombination
97 between directly repeated sequences occurs via both RecA-independent and RecA-dependent
98 mechanisms, depending on the size of the repeats and of the intervening sequences between
99 the repeated sequences [7-9]. Insertion of a sizable DNA sequence in between the repeated
100 sequences substantially increased the RecA dependence, suggesting that increasing the
101 distance separating the homologous regions preferentially inhibits the RecA-independent
102 recombination in *E. coli* [9,10]. In *E. coli*, RecA-independent rearrangements between short
103 repeats, such as deletions, are stimulated by mutations that affect the DNA polymerase or
104 other proteins involved in DNA replication [11-13] leading to the proposal that these events
105 occur during DNA replication by a mechanism involving mispairing of the newly synthesized
106 DNA strand with an alternative complementary template sequence located nearby [7,12] (for
107 review, see [14,15]). An alternate mechanism for RecA-independent deletion events involves
108 DNA breakage, exonucleolytic erosion of the DNA ends and single strand annealing (SSA) of
109 exposed complementary single stranded DNA [14]. A single strand annealing mechanism has
110 also been proposed for RecA-independent deletions associated with a restart of collapsed
111 replication forks [7,11,12,14,16]. Here, we measured the frequency of recombination between
112 direct repeats separated by intervening sequences of various lengths restoring a functional
113 *tetA* gene in the presence or absence of radiation-induced DNA double strand breaks in *D.*
114 *radiodurans*. We also assessed the involvement of the RecA, RecO, RecF, UvrD and DdrB

115 proteins in the deletion process. The role of these proteins in the progression of replication

116 forks was also discussed.

117

118 **Results**

119

120 **Efficient RecA-independent recombination between direct repeats in *D. radiodurans***

121 To investigate the role of recombination proteins in the occurrence of repeat-mediated
122 deletion events in *D. radiodurans*, we constructed a mutated *tetA* allele bearing an internal
123 duplication and a *spc* cassette inserted between the duplicated regions. The engineered *tetA*
124 allele was inserted into the dispensable *amyE* locus of chromosome 1 and provided a
125 recombination substrate in which the direct repeats (438 bp long) were separated by a 1,479 bp
126 spacer (Fig 1A). Precise deletion of one of the direct repeats and the intervening sequence
127 restores the wild type *tetA* allele. The presence of a functional *tetA* gene on one copy of
128 chromosome 1 suffices to confer tetracycline resistance to the cells, although *D. radiodurans*
129 bacteria contain 4 to 10 genome equivalents per cell. In contrast, when the deletion of a gene
130 generates a loss-of-function mutant, all the copies of the gene must be eliminated to detect the
131 mutant phenotype, and failure to obtain a homozygote provides a first indication that the gene
132 might encode a function essential for cell viability [3,17].

133 The frequency of spontaneous deletion events in a population was estimated by
134 measuring the frequency of [Tet^R] bacteria. As shown in Fig 1B, the median of the
135 frequencies of [Tet^R] in the wild type bacteria was 6.5×10^{-4} and did not decrease in $\Delta recA$
136 bacteria (median value: 8×10^{-4}). Does the apparent RecA-independent high frequency of
137 deletion events result from a functional redundancy of RecA activities in the cells? We tested
138 the involvement of the RadA protein, a RecA-related protein, and showed that wild type
139 frequencies of deletions were found in $\Delta radA$ and in $\Delta recA \Delta radA$ bacteria (Fig 1B),
140 suggesting that the RadA protein was not required in RecA-independent recombination to
141 compensate for the absence of the RecA protein. We also observed that the frequency of
142 [Tet^R] bacteria was not reduced in cells devoid of RecF or RecO proteins required for loading

143 RecA onto its single-stranded DNA substrate (Fig 1B). Altogether, our results suggest an
144 important contribution of RecA-independent mechanisms in the generation of deletions
145 between repeated DNA sequences in *D. radiodurans*.

146

147

148 **Differences between the DNA repeats reduces the frequency of the deletion events**

149 The presence of mutations in one of the 438 bp repeats (Fig 3A) reduced the frequency
150 of the deletion events between the chromosomal repeats. A single mutation sufficed to
151 significantly decrease the frequency of the deletion events as shown by median values that
152 decreased by a factor of 4.8 in *recA*⁺ bacteria and 4.6 in $\Delta recA$ bacteria, when compared to
153 fully homologous repeats. The decrease was greater when 3 mutations were present in one of
154 the repeats, yielding reduction factors of 10.0 and 19.0 in *recA*⁺ and $\Delta recA$ bacteria,
155 respectively (Fig 3B). A plot of the frequency of [Tet^R] bacteria as a function of the number
156 of differences shows a linear decrease in the deletion frequency with similar regression slopes
157 in *recA*⁺ and $\Delta recA$ bacteria (Fig S2).

158 A similar analysis was performed in *recA*⁺ $\Delta mutS$ and $\Delta recA$ $\Delta mutS$ bacteria devoid of
159 the MutS protein, the key enzyme involved in mismatch recognition. The data (Fig 3B and
160 Fig. S2) show that in this case the differences between the repeats did not significantly affect
161 the deletion frequency. These results suggest that, as in homologous recombination
162 intermediates, a heteroduplex DNA is formed during RecA-independent processes leading to
163 the reconstitution of a functional *tet* gene and that an efficient mismatch repair aborts
164 recombination between the DNA repeats in $\Delta recA$ as well as in *recA*⁺ bacteria.

165

166

167

168 **Absence of UvrD increases the frequency of deletions between the repeats**

169 It was previously shown that *uvrD* mutations stimulate RecA-dependent
170 recombination [21-23] and enhance tandem repeat deletions in *E. coli* [23]. Here, we show
171 that the absence of UvrD enhanced the efficiency of RecA-dependent recombination between
172 chromosomal and plasmid DNA by a factor of 21.2 (Fig 2B), suggesting that deinococcal
173 UvrD protein possesses an anti-RecA activity as previously shown for the *E. coli* UvrD
174 protein [24,25]. The absence of UvrD also enhanced the frequency of deletions between the
175 chromosomal direct repeats by a factor of 7.1 (Fig 1B). This increase may be due to the anti-
176 RecA activity of UvrD protein that can possibly inhibit RecA-dependent recombination
177 between the repeated sequences in a *recA*⁺ *uvrD*⁺ background. However, the absence of UvrD
178 might also disturb DNA replication, and thus increase genome instability. A clue to
179 understand how the absence of the UvrD protein might be involved, independently of its anti-
180 RecA activity, in the stimulation of deletion events requires an analysis of its effects in a
181 recombination-deficient background. Unfortunately, we were unable to obtain homozygotes
182 for *recA*, *recF* or *recO* deletion in combination with a *uvrD* deletion, even after extensive
183 purification steps (Fig S3), suggesting that *uvrD* deletion is lethal with a *recA*, *recF* or *recO*
184 deletion. We propose that the UvrD protein, by displacing obstacles downstream of the
185 replisome, plays an important role in the progression of replication forks (see discussion).

186

187 **Loss of viability of Δ *ddrB* Δ *recA* and Δ *ddrB* Δ *recO* double mutants**

188 Previous *in vitro* and *in vivo* results suggest that the DdrB protein plays a major role in
189 a single strand annealing process (SSA) that operates early in genome reconstitution after
190 DNA damage [4,6]. Single strand annealing is the only activity of DdrB known besides
191 binding to single strand DNA [5,6]. Thus, to analyse the involvement of SSA in generating

192 deletions via a RecA-independent pathway, we decided to construct double mutants devoid of
193 DdrB and RecA or RecO proteins. Homogenotization of $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$
194 double mutants was difficult, requiring 7 steps of purification, suggesting growth inhibition of
195 the mutated cells (Fig S3). Thus, we compared the growth rate and the plating efficiency of
196 the double mutants with those of the single $\Delta ddrB$, $\Delta recA$ and $\Delta recO$ mutants and of the
197 parental wild type strain. Wild type and $\Delta ddrB$ bacteria exhibited a generation time of 105
198 min. The recombination deficient bacteria grew more slowly, as $\Delta recA$ and $\Delta recO$ bacteria
199 during exponential growth showed a generation time of 285 min whereas $\Delta ddrB \Delta recO$ and
200 $\Delta ddrB \Delta recA$ exhibited a generation time of 370 min. Moreover, during exponential growth
201 phase, the single $\Delta recA$ and $\Delta recO$ mutants had a 15 fold decreased plating efficiency as
202 compared with the wild type, whereas the $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$ double mutants
203 had a 35 fold decreased plating efficiency (Fig 4). These results suggest that the DdrB protein
204 may be involved in management of blocked replication forks in the absence of the RecA or
205 RecO proteins. Another striking result was the increased lethality of the recombination
206 deficient mutants in late stationary phase. Indeed, after reaching a plateau after 6 hours of
207 incubation for the wild type and $\Delta ddrB$ bacteria, the number of CFU did not decrease during
208 70 additional hours of incubation. In contrast, the single $\Delta recA$ and $\Delta recO$ recombination
209 deficient mutants and the double $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$ mutants reached a plateau
210 after 18 to 20 hours of incubation and the number of CFU decreased 2-3 orders of magnitude
211 after 30 hours of incubation (Fig 4) suggesting that DNA lesions are generated during
212 prolonged stationary phase and require recombination functions to be repaired.

213

214

215 **An important role of DdrB in the recombination process between repeated sequences in**
216 **the absence of RecA or RecO proteins**

217 We found that the absence of DdrB had a strong negative effect on the frequencies of
218 deletions events between the chromosomal repeats generated via a RecA-independent
219 pathway. Indeed, when the repeats are separated by 1,479 bp, the median values of the
220 deletion frequencies in $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$ bacteria decreased by a factor of 4.9
221 and 5.1 respectively, as compared to their $\Delta recA$ and $\Delta recO$ counterparts (Fig 1B). These
222 results indicate that 80% of the [Tet^R] bacteria generated in the absence of RecA or RecO
223 proteins were formed in a DdrB-dependent manner, suggesting a major role of single strand
224 annealing in RecA-independent recombination between the direct repeats. We can also
225 hypothesize that the DdrB protein might be involved in the stabilization of DNA polymerase
226 template switching intermediates.

227

228 **The frequency of deletion events does not decrease when the length of the spacers**
229 **between the repeated sequences was as large as 10,500 bp**

230 In *E. coli*, in which both RecA-dependent and RecA-independent mechanisms can
231 contribute to recombination between direct repeats, deletion events become increasingly
232 RecA-dependent as the distance between the repeated sequences increases [9]. To verify if
233 this also applies in *D. radiodurans*, we modified the test deletion construct shown in Fig. 1 by
234 replacing the 1,479 bp spacer with sequences of increasing length to analyse the impact of the
235 distance between the repeats on the incidence of deletions and their genetic control (Fig 5A).

236

237 We found that the increase of the distance between the repeats from 1,479 bp (Fig. 1A)
238 up to 10,500 bp (Fig. 5A) had no effect on the deletion frequency in $recA^+$ as well as in $\Delta recA$
239 or $\Delta recF$ hosts (compare the [Tet^R] frequencies in Figs 1B and 5B, C, D). Likewise, the

240 distance between the repeats had no effect on the stimulation of deletion events by the
241 absence of the UvrD protein (Figs 1B and 5B, C, D).

242 In contrast, the involvement of DdrB in the deletion events became more apparent
243 when the distance between the repeats increased. Indeed, while a DdrB deficiency had no
244 effect on the frequency of deletions in a *recA*⁺ background when the spacer between the
245 repeats was 1,479 bp long, it produced a 2 to 3-fold decrease in the deletion frequency when
246 the spacer length increased (Figs 1B and 5B, C, D). When the *ddrB* deletion was associated
247 with a *recA* deletion, the reduction factors were found to be between 18- and 20-fold if the
248 length of the intervening sequences was $\geq 3,500$ bp as compared to their single Δ *recA*
249 counterparts (Figs 5B, C, D). A similar effect of a *ddrB* deletion was also observed in cells
250 devoid of the RecO protein (Figs 5B, C, D). These results suggest that, in the absence of the
251 RecA-promoted homologous recombination, approximately 95% of the recombination events
252 were dependent on the DdrB protein and may be related to an SSA pathway.

253

254 **Induction of recombination between direct repeats by ionizing radiation**

255 We used our deletion assay to analyze the impact of the presence of repeated sequence
256 on the stability of the genome in γ -irradiated cells during the process of genome
257 reconstitution. We showed that the frequency of repeat-induced deletions restoring a
258 functional *tetA* gene increased as a function of the dose of γ -irradiation used (Fig 6A). Thus,
259 we further exposed the cells to 5 kGy γ -irradiation, a dose producing hundreds of DNA
260 double strand breaks [26]. The repeats in the tested cells were separated either by 1,479 bp
261 (“short” spacer), 3,500 bp, 6,500 bp, or by 10,500 bp (“long” spacer) sequences. The deletion
262 analysis was performed only in a *recA*⁺ background, since the extreme radio-sensitivity of
263 Δ *recA* or Δ *recF* bacteria (cell survival was less than 10^{-5} after exposure to 5 kGy) precluded

264 the inclusion of these cells in the genetic assay. The deletions were induced by exposure to γ -
265 irradiation independently of the length of the spacers (Fig 6B).

266 As shown in Fig 6, in the wild type bacteria, the deletion frequency increased by 11.9
267 fold and 5.9 fold after irradiation when the repeats are separated by the "short" spacer and the
268 "long" spacer, respectively (compare left panels in Figs 6C and D). In cells devoid of the
269 UvrD protein, the frequency of deletions moderately increased after irradiation (induction
270 factors of 1.45 and 1.7 for the "short" and "long" spacer, respectively), likely because these
271 cells already have an elevated spontaneous level of recombination in the absence of
272 irradiation (compare right panels in Figs 6C and D). In contrast, cells devoid of the DdrB
273 protein showed a marked reduction in the induced levels of deletion events (compare middle
274 panels in Figs 6C and D), suggesting that single strand annealing might play an important role
275 in the generation of the [Tet^R] recombinants during genome reconstitution after irradiation.

276

277

278 **Discussion**

279

280 Repeated sequences are targeted by recombination processes leading to amplifications,
281 deletions, and other rearrangements of the genetic material. These events play an important
282 role in genome plasticity and rapid adaptation to environmental challenges, but are also
283 potential source of genome instability and can be deleterious to an organism (see for review
284 [27]). *D. radiodurans* contains an enhanced number of repetitive sequences as compared to
285 other bacteria, including insertion sequences, small non-coding repeats, and intragenic repeats
286 (see for review [28]). This bacterium is also known for its capacity to reconstitute an entire
287 genome from a myriad of fragments after exposure to elevated γ -irradiation doses. Genome
288 reconstitution occurs through extended synthesis dependent single strand annealing (ESDSA)
289 followed by classical homologous recombination. In heavily irradiated cells, a RecA-
290 independent single strand annealing (SSA) process takes place before ESDSA allowing the
291 assembly of small fragments into substrates that can be further processed through ESDSA.
292 The single strand annealing activity of the DdrB protein plays a major role in this early step of
293 DNA double strand break repair [4].

294 Here, we show that DdrB also plays a key role in RecA-independent recombination
295 between direct repeats, leading to the occurrence of deletions, and substantially contributes to
296 the induction of deletions in γ -irradiated *recA*⁺ bacteria. Our results points to an important
297 contribution of a DdrB-dependent pathway in *D. radiodurans* genome plasticity.

298

299 **Efficient mechanisms ensure recombination between chromosomal direct repeats in *D.***
300 ***radiodurans* cells devoid of the RecA protein.**

301 Here, we determined the frequencies of spontaneous and radiation-induced
302 recombination between chromosomal direct repeats and investigated the role of RecA and of

303 other key recombination and repair proteins in the occurrence of these events in *D.*
304 *radiodurans*. We found that recombination events restoring a functional *tetA* gene occurred at
305 a very high frequency. In a *recA*⁺ background, the median frequency of [Tet^R] cells was equal
306 to 6.5×10^{-4} (Figs 1 and 5B, C, D), values more than 10-fold higher than those measured in a
307 study that used a similar substrate (chromosomal 358 bp direct repeats separated by an
308 intervening sequence of 850 bp) to measure recombination in *Helicobacter pylori*, a
309 bacterium known for its high recombination proficiency [29]. Moreover, inactivation of *recA*
310 resulted in a 10-fold decrease in recombination between the direct repeats in *H. pylori* [29]. In
311 contrast, introduction of a $\Delta recA$, $\Delta recF$ or $\Delta recO$ mutation in the *D. radiodurans* tester
312 strains did not change the elevated recombination frequencies between the repeats (Figs 1 and
313 5B, C, D). In *E. coli* and in *B. subtilis*, the distance between the repeats plays a key role in
314 determining the mechanisms involved in the recombination processes, the efficiency of RecA-
315 independent recombination decreasing sharply when the distance between the repeats
316 increases [9 ,10 ,30]. No such proximity effect was observed in *D. radiodurans*. Indeed, the
317 frequency of appearance of the recombinants in our assay remained elevated in $\Delta recA$ (and
318 $\Delta recF$ or $\Delta recO$) bacteria as in the parental *rec*⁺ bacteria when the spacer between the repeats
319 increased from 1,479 up to 10,500 bp (Fig 5).

320 Our results suggest that, in the absence of RecA (or in the absence of “facilitator”
321 proteins required for loading RecA onto its single-stranded DNA substrate), alternate
322 pathways ensure recombination between repeated sequences in *D. radiodurans*. These RecA-
323 independent pathways do not necessarily predominate in *recA*⁺ bacteria, although we
324 observed a similar frequency of recombinants in *recA*⁺ and $\Delta recA$ bacteria. Indeed, $\Delta recA$ (or
325 $\Delta recF$ or $\Delta recO$) bacteria had a low plating efficiency with less than 10% of cells able to
326 form colonies.

327

328 **Does replication slippage account for RecA-independent recombination between**
329 **chromosomal direct repeats?**

330 In *E. coli*, mutations in components of the DNA Pol III holoenzyme result in elevated
331 levels of tandem repeat rearrangements, supporting the idea that RecA-independent
332 recombination occurs during the process of chromosome replication [14]. A replication
333 slipped misalignment model [14] proposed that a pause in DNA synthesis and dissociation of
334 the polymerase from its template allows the nascent strand to translocate to a new pairing
335 position. Slipped misalignment is thought to occur on single-stranded DNA and thus more
336 frequently during lagging-strand synthesis [14]. The availability of single-stranded DNA on
337 the lagging-strand template, and thus, the length of the Okazaki fragments, might constitute
338 parameters that govern the efficiency of the deletion events and might explain the strong
339 dependence of the deletion frequencies on the proximity of the repeated sequences [14]. Our
340 findings that the distance between the repeats in the 1-11 kb range has no influence on the
341 deletion frequency raise the question as to whether these events were generated through a
342 slipped misalignment mechanism, thus implying the presence of very large single stranded
343 DNA regions on the lagging strand template in *D. radiodurans*. A response to this question
344 awaits better knowledge of the replication machinery in *D. radiodurans* and a determination
345 of the average size of Okazaki fragments in this bacterium.

346

347 **Involvement of single strand annealing in RecA-independent recombination between**
348 **chromosomal direct repeats.**

349 We found that the frequencies of the deletion events in $\Delta recA \Delta ddrB$ (or $\Delta recO$
350 $\Delta ddrB$) bacteria were reduced 5-fold and 18- to 20-fold as compared with those measured in
351 the single $\Delta recA$ (or $\Delta recO$) mutant counterparts (Figs. 1B and 5) in strains containing repeats
352 separated by 1479 bp and 3,500 to 10,500 bp, respectively. These results strongly suggest that

353 the DdrB protein strongly stimulates RecA-independent recombination in *D. radiodurans*.
354 The DdrB protein was shown to bind single stranded DNA [5] and to mediate *in vitro* fast
355 annealing of complementary oligomers [6]. *In vivo*, the single strand annealing activity of
356 DdrB is supported by its involvement in plasmid establishment during natural transformation
357 [4]. Thus, we propose that RecA-independent recombination between direct repeats occurs
358 mainly through a DdrB-dependent single strand annealing (SSA) pathway. SSA was first
359 proposed to explain circularization of linear duplex phage DNA containing terminal
360 repetitions by annealing complementary terminal single overhangs [31]. The SSA model was
361 postulated later to take place in eukaryotic cells [32,33] where it is facilitated by RPA and
362 RAD52 in a RAD51-independent manner [34,35]. SSA involves an initial DNA double strand
363 break in the sequence between the duplications followed by the action of a 5' to 3'
364 exonuclease to expose single stranded regions in both repeats that are subsequently aligned
365 and annealed by the RAD52-RPA-ssDNA ternary complex. Annealed intermediates are then
366 processed by digestion of the displaced single stranded DNA, polymerase filling-in and
367 ligation to generate the final recombination product (For review, see [36]).

368 Although DdrB does not share sequence similarity with the eukaryotic RAD52
369 protein, it might act as its functional equivalent [37,38]. The activity of the RAD52 protein is
370 strongly stimulated by the presence of RPA [39,40]. In contrast, the single strand annealing
371 activity of DdrB is not stimulated but rather inhibited by inclusion of the SSB protein in the *in*
372 *vitro* annealing reaction [4,6]. The deinococcal SSB protein is an essential protein and the
373 DdrB protein is unable, even when overexpressed, to replace SSB for cell viability [41]. SSB
374 is crucial for all aspects of DNA metabolism [42] while DdrB seems to have a more
375 specialized role in DNA repair and plasmid transformation by stimulating the SSA pathway.
376 Both DdrB and SSB bind to 3' single stranded tails of resecting ends [5]. The ends can be
377 engaged in two alternative pathways: annealing to complementary ssDNA in the SSA

378 pathway, or, depending on the formation of a RecA nucleofilament, invasion of homologous
379 dsDNA to promote strand exchange in homologous recombination or to prime DNA synthesis
380 in ESDSA. Polymerization of RecA on ssDNA requires the displacement of SSB or DdrB
381 from ssDNA. The SSB protein can be efficiently displaced through the action of RecO and
382 RecR proteins [43,44]. DdrB protein binds more tightly than SSB to ssDNA [5] and might be
383 displaced with more difficulty from ssDNA. We propose that, in *D. radiodurans*, homologous
384 recombination and SSA might also compete for substrate in making deletions between direct
385 repeats. Reams *et al.* [45] proposed that, in *Salmonella enterica*, a single-strand annealing
386 pathway might also be activated to generate duplication between tandem copies of the
387 ribosomal RNA genes (*rrn*) when two single-stranded DNA ends are provided and neither
388 strand is coated with inhibitory RecA protein. Under these conditions, the activation of single-
389 strand annealing might compensate the loss of homologous recombination [45].

390

391 **A single strand annealing mechanism is involved in the rescue of stalled replication fork**
392 **in $\Delta recA$ bacteria**

393 We found that $\Delta recA$ (or $\Delta recO$) bacteria had a 15 fold decreased plating efficiency as
394 compared with the wild type during exponential growth phase (Fig 4). This important lethal
395 sectoring suggests that problems resulting in the arrest of replication fork (see for review [46])
396 occur at high frequency in *D. radiodurans*, and that RecA-mediated recombination plays a
397 key role in the recovery of stalled replication forks in this bacterium. A further (2-fold)
398 decreased plating efficiency was observed when a DdrB deficiency was combined with a
399 RecA (or RecO) deficiency (Fig 4). These results are consistent with a single strand annealing
400 model but also with any model that envisions annealing of complementary DNA strands, for
401 example misannealing of the direct repeats during recovery from replication fork collapse in
402 cells devoid of the RecA protein. *D. radiodurans* also seems to be very sensitive to prolonged

403 stationary phase, with a rapid loss of cell viability when proteins involved in homologous
404 recombination were absent, suggesting that DNA double strand breaks were generated in
405 “old” cells and could not be repaired in the absence of RecA or RecO proteins.

406

407 **Absence of UvrD increases the frequency of recombination between the repeats**

408 Another important feature was the increased recombination frequency between
409 repeated sequences measured in a *D. radiodurans* mutant devoid of the UvrD protein at a
410 level almost equivalent to those measured after irradiation of wild type bacteria (Fig. 6). It
411 was previously shown that *uvrD* mutations enhance tandem repeat deletion in the *E. coli*
412 chromosome [23,47] and stimulate RecA-dependent recombination [21,48,49]. In *E. coli*,
413 mutations in *uvrD* induce the SOS response, a common phenotype in cells with replication
414 defects [50]. The obstacles possibly encountered by replication forks during their progression
415 are multiple, such as tightly bound proteins, nicks or DNA lesions. The Rep helicase acts by
416 dislodging proteins in front of replication forks [51-53] and its absence results in a marked
417 slowing down of replication progression [54], suggesting increased fork arrest. Simultaneous
418 inactivation of Rep and UvrD helicases is lethal in *E. coli* [23] suggesting that UvrD might
419 partially substitute for the Rep protein in ensuring replication progression [55]. In favour of
420 this hypothesis, it was recently shown that UvrD displaces the obstacles downstream of the
421 replisome *in vitro* [52] and plays a major role to displace transcription complexes [56].
422 Moreover, it was proposed that UvrD acts at blocked replication forks by clearing RecA,
423 facilitating replication fork reversal [57,58], a hypothesis supported by the ability of UvrD to
424 directly remove RecA nucleoprotein filaments *in vitro* [25].

425 In *D. radiodurans*, we previously showed that inactivation of *uvrD* results in a marked
426 slowing down of replication progression in un-irradiated cells [3]. During post-irradiation
427 recovery through ESDSA, the absence of UvrD results in a delayed kinetics of DNA double

428 strand break repair that coincided with delayed and less extensive DNA synthesis than that
429 observed in the wild type cells [3]. *D. radiodurans* bacteria are naturally devoid of the RecB
430 and RecC proteins, and it was suggested that UvrD, in association with the RecJ exonuclease,
431 might play an important role in the processing of DNA double strand ends required for
432 priming of DNA synthesis, but also may act in the DNA synthesis elongation step of ESDSA
433 and more generally may play an important role for the progression of replication forks [3]. It
434 is important to notice that we were unable to obtain mutants devoid of the RecJ protein [3],
435 and *recJ* mutants constructed by Hua and his collaborators were shown to grow very slowly
436 and to be thermosensitive [59].

437 In *D. radiodurans*, we were unable to delete the *recA* gene when bacteria were devoid
438 of the UvrD protein, suggesting lethality of *uvrD* and *recA* deficiencies. These results are
439 reminiscent of phenotypes observed in particular *rad3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
440 The RAD3 gene, a homolog of the human gene XPD, encodes a helicase which is a
441 component of the NER apparatus as part of the transcription factor TFIIH. Interestingly *rad3-*
442 *101* and *rad3-102* mutants accumulate DNA double strand breaks and are lethal when in
443 combination with mutations in recombinational repair genes, strongly suggesting that Rad3
444 protein influences either the generation of DNA double strand breaks or their processing by
445 homologous recombination [60].

446 We propose that the absence of UvrD in *D. radiodurans* may disturb the progression
447 of the replication fork, and thus might, as RAD3 in *S. cerevisiae*, influence the generation of
448 DNA double strand break, favouring recombination and also single strand annealing between
449 DNA repeats.

450

451

452 **Induction of recombination between direct repeats by ionizing radiation**

453 We used our assay to analyze the impact of the presence of repeated sequence on the
454 stability of the genome in γ -irradiated cells. We found that exposure to a dose of 5 kGy γ -
455 irradiation increased the recombination level about 10-fold in the wild type but to a lesser
456 extent in cells devoid of the DdrB protein, suggesting that SSA might play an important role
457 in recombination between the duplicated sequences during the process of genome
458 reconstitution.

459 In *D. radiodurans*, interplasmidic recombination between homologous regions was
460 previously shown to be induced by exposure to γ -radiation [61]. Moreover, when two Tet^S
461 alleles were inserted on the same chromosome into two randomly distant sites, 2% of Tet^R
462 bacteria were found among the surviving cells exposed to 17.5 kGy, whereas Tet^R isolates
463 were only very rarely found without irradiation [62]. Interestingly, when two slightly different
464 *E. coli* plasmids were inserted in the *D. radiodurans* genome generating adjacent duplication
465 insertions, circular derivatives of the tandemly integrated plasmids were formed in the first
466 1.5 h postirradiation before the onset of *recA*-dependent repair in cells exposed to 17.5 kGy γ -
467 irradiation. These circular derivatives had structures consistent with the hypothesis that DNA
468 repair occurred immediately postirradiation by a *recA*-independent single strand annealing
469 process [63]. These authors proposed that SSA may be a preparatory step for further DNA
470 repair in wild-type *D. radiodurans*, a hypothesis in accordance with our recent results,
471 suggesting that DdrB-dependent single-strand annealing might facilitate the assembly of the
472 myriad of small fragments generated by extreme radiation exposure to generate suitable
473 substrates for subsequent ESDSA-promoted genome reconstitution [4]. Genome reassembly
474 in irradiated *D. radiodurans* cells was considered for a long time as an error-free process
475 since no genome rearrangements were detected after post-irradiation DNA repair. Gross
476 chromosomal rearrangements were detected for the first time in *recA*⁺ *D. radiodurans* cells

477 exposed to extremely high γ -doses (25 kGy) and in *recA* mutant cells that survived 5 kGy γ -
478 radiation [64]. The *recA* mutants were also shown to be prone to spontaneous DNA
479 rearrangements during normal exponential growth [64]. These authors presumed that SSA, by
480 pairing ectopic repetitive sequences, may be the main source of these chromosomal
481 rearrangements, a hypothesis reinforced by our results suggesting an important role of SSA in
482 recombination between repeated sequences (this work), in DNA double strand break repair in
483 cells devoid of the RecA protein [4,6], and in early reassembly of small DNA fragments when
484 cells were exposed to high γ -doses [4].

485

486 **Conclusion**

487 Altogether, these results suggest that SSA plays a major role in RecA-independent
488 recombination between repeated sequences in the radioresistant *D. radiodurans* bacterium. In
489 un-irradiated wild type bacteria, the deletion events might result, as proposed by Susan Lovett
490 in *E. coli*, from RecA-dependent intermolecular unequal crossing over or intramolecular
491 recombination between the overlapping 5' and 3' regions of the *tetA* gene, and from RecA-
492 independent processes such as replication slippage or template switching [10] or single strand
493 annealing [10,14]. Difficulties in replication can lead to breakage of the fork when replication
494 forks are halted by obstacles or DNA damage in virtually every cell and every cell generation
495 [65,66]. If this occurs in the context of repeated DNA sequences, single-stranded DNA
496 substrates might be generated by resection of the DNA ends, and genetic rearrangements can
497 result through strand-invasion of the broken chromosome with its sister or through SSA at the
498 repeats. Replication of damaged DNA templates can further elevate the probability of fork
499 breakage [67,68]. Moreover, when *D. radiodurans* cells were exposed to a dose of 5 kGy γ -
500 irradiation, generating hundreds DNA double strand breaks, DdrB-dependent SSA and RecA-
501 dependent ESDSA processes involved in DNA double strand break repair increased the

502 opportunities to generate deletion events when DNA repeats are present in the DNA
503 fragments.

504

505

506 **Materials and Methods**

507

508 **Culture, media**

509 *D. radiodurans* strains were grown at 30°C, 150 rpm in TGY2X (1% tryptone, 0.2%
510 dextrose, 0.6% yeast extract) or plated on TGY1X containing 1.5% agar. *E. coli* strains were
511 grown at 37 °C, 150 rpm in Lysogeny Broth (LB). When necessary, media were
512 supplemented with the appropriate antibiotics used at the following final concentrations:
513 kanamycin, 6 µg/mL; chloramphenicol, 3.5 µg/mL; hygromycin, 50 µg/mL; spectinomycin,
514 75 µg/mL; tetracycline 2.5 µg/mL for *D. radiodurans* and kanamycin, 25 µg/mL or
515 spectinomycin 40 µg/mL for *E. coli*.

516

517 **Bacterial strains and plasmids**

518 The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The *E. coli*
519 strains used were DH5α as the general cloning host, and SCS110, a *dam dcm* mutant strain,
520 to propagate plasmids prior introduction into *D. radiodurans* via transformation [69].
521 Transformation of *D. radiodurans* with genomic DNA, PCR products, or plasmid DNA was
522 performed as described [70]. All *D. radiodurans* strains were derivatives of strain R1 ATCC
523 13939. The genetic structure and the purity of the mutant strains were checked by PCR.
524 Oligonucleotides used for strain constructions and diagnostic PCR will be provided on
525 request.

526

527 Construction of tester strains for recombination assays:

528 The strain GY12947 was constructed by the integration of the *tetA* gene into the
529 dispensable *amyE* (*DR_1472*) gene by transformation of GY9613 (ATCC 13939 R1 strain) by
530 the tripartite ligation product containing the 5' and 3' parts of *amyE* and the *tetA* gene
531 amplified by PCR using GY9613 genomic DNA and plasmid p11615 as template,
532 respectively.

533 GY12947 was then used to amplify the 778 bp of the 5' part (called 5'*tetA*) and the
534 850 bp of the 3' part (called 3'*tetA*) of the coding region of the 1,190 bp *tetA* gene. The 5'*tetA*
535 and 3'*tetA* fragments contain 438 bp overlapping sequences. Tripartite ligation products
536 containing the 5'*tetA* and 3'*tetA* fragments separated by spacers of 1,479, 3,500 or 4,500 bp
537 containing a *spec* gene amplified by PCR from plasmid p11554 were used to transform
538 GY12947 giving rise to GY12949, GY16209, GY16211, respectively. Independent clones
539 were saved for each strain and constructions were verified by DNA sequencing. Mutations
540 generated during PCR amplification of 5'*tetA* using GY12947 as template were detected in
541 the 438 bp overlapping sequence of the 5'*tetA* in two clones of GY12949 and the strains
542 containing mutations in the 5'*tetA* overlapping region were renamed GY12948 (3 mutations)
543 and GY12950 (1 mutation).

544 Strains with larger spacers between the *tetA* overlapping regions were obtained by
545 transformation of GY16209 and GY16211 with a tripartite ligation product of a 3,000 or
546 6,000 bp PCR fragment containing the *hph* gene amplified from plasmid p15070, and 5' and
547 3' regions of the *spec* gene amplified by PCR from GY12949 yielding GY16227 containing a
548 6,500 bp spacer and GY16235 containing a 10,500 bp spacer, respectively. The right
549 integration of spacers, and the purity of the strains were checked by PCR. The 5'*tetA*, the
550 3'*tetA* and the intervening sequences were checked by DNA sequencing.

551 For the recombination assays between chromosomal and plasmid DNA, strain
552 GY15102, in which the 5' region of the *tetA* gene (5'*tetA*) and an *hph* cassette were inserted
553 in the *amyE* gene, was transformed by the plasmid p15002 obtained by cloning in plasmid
554 p11554 of the 3'*tetA* region to give rise to strain GY15147. Plasmid and chromosomal DNA
555 contained the same 438 bp homologous sequences as those present in the genomic DNA of
556 strains used for measurement of inter- or intra-chromosomal recombination.

557 Deletion mutant derivatives of all the recombination tester strains were obtained by
558 transformation of the tester strains with genomic DNA of $\Delta recA$, $\Delta mutS$, $\Delta uvrD$, $\Delta recF$,
559 $\Delta recO$, $\Delta ddrB$, $\Delta radA$ derivatives of R1 strain, available in the laboratory or constructed by
560 the tripartite ligation method [71]. The $\Delta recA\Delta radA$, $\Delta recA\Delta mutS$, $\Delta recA\Delta ddrB$,
561 $\Delta recO\Delta ddrB$ double mutants were obtained by transformation of the single $\Delta radA$, $\Delta mutS$ or
562 $\Delta ddrB$ mutants by genomic DNA of $\Delta recA$ or $\Delta recO$ bacteria. $\Delta uvrD$ bacteria were also
563 transformed by genomic DNA of $\Delta recA$, $\Delta recF$ and $\Delta recR$ bacteria. All strains were
564 extensively purified on selective medium to obtain homogenotization of the deletions before
565 to be checked by PCR for their purity. Attempts to obtain homogenotes containing the
566 $\Delta uvrD\Delta recA$ allele, the $\Delta uvrD\Delta recF$ allele and the $\Delta uvrD\Delta recR$ allele on each of the multiple
567 genomic copies present in *D. radiodurans* were unsuccessful, even after extensive purification
568 on selective plates (see Results section).

569

570 **Inter- or intra-chromosomal recombination**

571 Cells were plated on TGY agar and incubated at 30 °C for 3 days, or 5 days for $\Delta recA$, $\Delta recO$
572 and $\Delta recF$ mutant bacteria and 7 days for double mutant $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$
573 bacteria. Three to six colonies per strain were inoculated in 3 mL of TGY2X and incubated at
574 30°C, 150 rpm. Appropriate dilutions of the bacterial cultures, grown to $OD_{650nm} = 1.5$ were
575 plated on TGY and TGY + tetracycline 2.5 µg/mL. Colonies were counted after 4 to 7 days of

576 incubation at 30 °C. The experiments were repeated at least three times, using, when possible,
577 strain isolates obtained independently during the strain constructions.

578 To measure recombination between repeated sequences after γ -irradiation, bacterial
579 strains were treated as previously described upstream, except that bacterial cultures were
580 grown to an $OD_{650nm} = 0.5$ before being concentrated by centrifugation in TGY2X to an
581 $OD_{650nm} = 10$ and irradiated on ice at a dose of 5 kGy with a ^{60}Co irradiation system
582 (LABRA, CEA, Saclay) at a dose rate of 100 Gy/min. Following irradiation, samples of
583 100 μ L were inoculated in 4.9 mL of TGY2X and incubated at 30°C, 150 rpm. After 20 hours
584 of post-irradiation incubation, appropriate dilutions of bacterial culture were plated on TGY
585 and TGY + tetracycline 2.5 μ g/mL. Colonies were counted after 4-7days of incubation at
586 30 °C. Unirradiated controls were treated as irradiated cells, except that they were maintained
587 on ice without irradiation during the period when the irradiated cells were exposed to γ -rays.
588

589 **Recombination between chromosomal and plasmid DNA**

590 Cells containing plasmid p15002 were plated on TGY agar + spectinomycin (75 μ g/mL) and
591 incubated at 30 °C during 3 days (or 5 days for $\Delta recA$ and $\Delta recF$ bacteria). Three colonies per
592 strain were inoculated in 3 mL of TGY2X + spectinomycin (75 μ g/mL) and incubated at
593 30°C, 150 rpm. Appropriate dilutions of the bacterial cultures grown to $OD_{650nm} = 1.5$ were
594 plated on TGY and TGY+ tetracycline 2.5 μ g/mL. Colonies were counted after 4 to 7 days of
595 incubation at 30 °C.

596

597 **Growth rate and lethal sectoring of $\Delta ddrB \Delta recA$ and $\Delta ddrB \Delta recO$ double mutants**

598 Strains were streaked on TGY plates supplemented with the appropriate antibiotics.
599 Independent colonies were inoculated in 3 mL TGY2X supplemented with the appropriate
600 antibiotics (only kanamycin for double mutants) and grown at 30°C to an $OD_{650nm} = 1.5$.

601 Cultures were then diluted 200 to 5,000 fold and grown overnight at 30°C to an OD_{650nm} = 0.1
602 (time 0 of the growth curves). Then, the OD_{650nm} was measured and appropriate dilutions
603 were plated on TGY plates at different times during 80 h of incubation at 30°C with agitation
604 (150 rpm). Colonies were counted after 3 (WT or $\Delta ddrB$ bacteria), 5 ($\Delta recA$ or $\Delta recO$
605 bacteria) or 7 days ($\Delta ddrB \Delta recA$ or $\Delta ddrB \Delta recO$ bacteria) of incubation at 30°C.

606

607 **Statistical analysis**

608 In Fig.1, 3 and 5, in order to establish the statistical differences between the [Tet^R]
609 frequencies measured in mutant and WT strains, non parametric Dunn's multiple comparison
610 test [75] were used, taking into account the p-value correction and performed with the
611 GraphPad Prism6 software. All the comparisons were bi-sided.

612 Linear regressions and the slope significances observed in Fig. S2 were estimated using the
613 GraphPad Prism6 software.

614 In Fig 6, statistically significant differences between the irradiated and the non-irradiated
615 conditions were calculated by non-parametric Mann-Withney tests performed in GraphPad
616 Prism 6 software.

617

618

Bacterial strains	description	source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
SCS110	<i>endA dam dcm supE44Δ(lac-proAB)</i> (<i>F'</i> - <i>traD36 proABlac^fZΔM15</i>)	Laboratory stock
<i>D. radiodurans</i>		
GY9613	R1 ATCC 13939	Laboratory stock
GY12958	as R1 but $\Delta radA\Omega cat$	This work
GY12965	as R1 but $\Delta recF\Omega cat$	[3]
GY12966	as R1 but $\Delta recO\Omega hph$	[3]
GY12967	as R1 but $\Delta recR\Omega cat$	[3]
GY12968	as R1 but $\Delta recA\Omega kan$	[3]
GY12977	as R1 but $\Delta mutS1\Omega cat$	This work
GY13915	as R1 but $\Delta ddrB\Omega cat$	This work
GY15123	as R1 but $\Delta uvrD\Omega kan$	This work
GY15125	as R1 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY15180	as R1 but $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY16004	as R1 but $\Delta uvrD\Omega cat$	This work
GY16262	as R1 but $\Delta recO\Omega cat$	This work
GY16626	as GY13915 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16636	as GY13915 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY12947	<i>amyE</i> :: <i>P_{groE}::tetA</i> :: <i>'amyE</i>	This work
GY12949 ^(a)	<i>amyE</i> ::(<i>P_{groE}</i> ::5' <i>tetA</i> :: <i>P_{out}</i> :: <i>spc_{1,479}</i> ::3' <i>tetA</i>):: <i>'amyE</i>	This work
GY15184	as GY12949 $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY12956	as GY12949 but $\Delta radA\Omega cat$	This work
GY12971	as GY12956 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY12978	as GY12949 but $\Delta mutS1\Omega cat$	This work
GY16620	as GY12978 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY12950 ^(b)	as GY12949 but 1 mutation C420T in 5' <i>tetA</i> '	This work
GY12980	as GY12950 but $\Delta mutS1\Omega cat$	This work
GY16624	as GY12950 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16618	as GY12980 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY12948 ^(b)	as GY12949 but 3 mutations G410A, A620G, delA767 in <i>tetA</i> '	This work
GY12979	as GY12948 but $\Delta mutS1\Omega cat$	This work
GY16622	as GY12948 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16616	as GY12979 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY12963	as GY12949 but $\Delta recO\Omega hph$	This work
GY12955	as GY12949 but $\Delta recF\Omega cat$	This work
GY12953	as GY12949 but $\Delta uvrD\Omega cat$	This work
GY16016	as GY12949 but $\Delta ddrB\Omega cat$	This work
GY16628	as GY16016 but $\Delta recA\Omega kan$	This work

GY16638	as GY16016 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY16209 ^(a)	$amyE' :: (P_{groE} :: 5'tetA::P_{out} :: spc_{3,500} :: 3'tetA) :: amyE$	This work
GY16238	as GY16209 but $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY16264	as GY16209 but $\Delta recF\Omega cat$	This work
GY16262	as GY16209 but $\Delta recO\Omega cat$	This work
GY16608	as GY16209 but $\Delta uvrD\Omega cat$	This work
GY16268	as GY16209 but $\Delta ddrB\Omega cat$	This work
GY16630	as GY16268 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16640	as GY16628 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY16227 ^(a)	$amyE' :: (P_{groE} :: 5'tetA::P_{out} :: spc_{3,500} :: hph_{3000} :: 3'tetA) :: amyE$	This work
GY16244	as GY16227 but $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY16276	as GY16227 but $\Delta recF\Omega cat$	This work
GY16278	as GY16227 but $\Delta recO\Omega cat$	This work
GY16612	as GY16227 but $\Delta uvrD\Omega cat$	This work
GY16282	as GY16227 but $\Delta ddrB\Omega cat$	This work
GY16632	as GY16282 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16642	as GY16282 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY16211 ^(a)	$amyE' :: (P_{groE} :: 5'tetA::P_{out} :: spc_{4,500} :: 3'tetA) :: amyE$	This work
GY16235 ^(a)	$amyE' :: (P_{groE} :: 5'tetA::P_{out} :: spc_{4,500} :: hph_{6000} :: 3'tetA) :: amyE$	This work
GY16252	as GY16235 but $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY16292	as GY16235 but $\Delta recF\Omega cat$	This work
GY16290	as GY16235 but $\Delta recO\Omega cat$	This work
GY16614	as GY16235 but $\Delta uvrD\Omega cat$	This work
GY16296	as GY16235 but $ddrB\Omega cat$	This work
GY16634	as GY16296 but $\Delta recA\Omega kan$	This work
GY16644	as GY16296 but $\Delta recO\Omega kan$	This work
GY15102 ^(a)	$amyE' :: (P_{groE} :: 5'tetA' :: P_{kat} :: hph) :: amyE$	This work
GY15147	GY15102 (p15002)	This work
GY15149	as GY15147 but $\Delta radA\Omega cat$	This work
GY15156	as GY15147 but $\Delta uvrD\Omega kan$	This work
GY15158	as GY15147 but $\Delta recA\Omega cat$	This work
GY15160	as GY15147 but $\Delta recF\Omega cat$	This work

Plasmids

p11615	Source of <i>tetA</i> cassette in <i>D. radiodurans</i>	[71]
p11086	Source of <i>kan</i> cassette in <i>D. radiodurans</i>	Laboratory stock
p11520	Shuttle vector <i>E. coli</i> / <i>D. radiodurans</i> , <i>spec</i>	[72]
p11554	Deletion of the <i>cat</i> gene in p11520, shuttle vector <i>E. coli</i> / <i>D. radiodurans</i> , <i>spec</i>	Laboratory stock
p13025	pUC18 derivative encoding <i>lacZ</i>	[73]
p12625	pUC19 containing <i>hph</i> and <i>D. radiodurans katA</i> promoter (alias pKatHPH4)	[74]
p15002 ^(a)	3' <i>tetA</i> inserted in p11554 between <i>StuI</i> and <i>BamHI</i> restriction sites	This work
P15070	Insertion between <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i> sites of p13025 of a PCR fragment containing the <i>P_{kat}::hph</i> gene amplified from p12625	This work

619 **Table 1. Bacterial strains and plasmids.**

620 ^(a) 5'*tetA* and the 3'*tetA* contain the 1-779 and the 342-1190 part of the *tetA* coding region,
621 respectively. They contain a 342-779 overlapping region. The positions are numbered
622 relatively to the first base of the initiation codon of *tetA*.

623 ^(b) The positions of the mutations in the 5'*tetA* fragment are numbered relatively to the first
624 base of the initiation codon of *tetA*.

625

626 **Acknowledgments**

627 We thank Adriana Bailone for valuable discussions, suggestions and critical reading of the
628 manuscript, and Michael DuBow for polishing our English. We thank the Institut Curie for
629 the use of the ¹³⁷Cs irradiation system.

630

631 **References**

632

- 633 1. Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, et al. (2006) Reassembly of
634 shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443: 569-573.
- 635 2. Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M (2009) Recombination and replication in DNA
636 repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136: 1044-1055.
- 637 3. Bentschikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2010) A major role of the RecFOR pathway
638 in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*.
639 *PLoS Genet* 6: e1000774.
- 640 4. Bouthier de la Tour C, Boissard S, Norais C, Toueille M, Bentschikou E, et al. (2011) The
641 deinococcal DdrB protein is involved in an early step of DNA double strand break
642 repair and in plasmid transformation through its single-strand annealing activity. *DNA*
643 *Repair (Amst)* 10: 1223-1231.
- 644 5. Norais CA, Chitteni-Pattu S, Wood EA, Inman RB, Cox MM (2009) An alternative
645 *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation: The DdrB protein. *J*
646 *Biol Chem*.
- 647 6. Xu G, Lu H, Wang L, Chen H, Xu Z, et al. (2010) DdrB stimulates single-stranded DNA
648 annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*.
649 *DNA Repair (Amst)* 9: 805-812.
- 650 7. Mazin AV, Kuzminov AV, Dianov GL, Salganik RI (1991) Mechanisms of deletion
651 formation in *Escherichia coli* plasmids. II. Deletions mediated by short direct repeats.
652 *Mol Gen Genet* 228: 209-214.
- 653 8. Dianov GL, Kuzminov AV, Mazin AV, Salganik RI (1991) Molecular mechanisms of
654 deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. I. Deletion formation mediated by
655 long direct repeats. *Mol Gen Genet* 228: 153-159.
- 656 9. Bi X, Liu LF (1994) *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid
657 recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J Mol Biol*
658 235: 414-423.
- 659 10. Lovett ST, Gluckman TJ, Simon PJ, Sutera VA, Jr., Drapkin PT (1994) Recombination
660 between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive
661 mechanism. *Mol Gen Genet* 245: 294-300.
- 662 11. Bierne H, Vilette D, Ehrlich SD, Michel B (1997) Isolation of a *dnaE* mutation which
663 enhances *RecA*-independent homologous recombination in the *Escherichia coli*
664 chromosome. *Mol Microbiol* 24: 1225-1234.
- 665 12. Saveson CJ, Lovett ST (1997) Enhanced deletion formation by aberrant DNA replication
666 in *Escherichia coli*. *Genetics* 146: 457-470.
- 667 13. Saveson CJ, Lovett ST (1999) Tandem repeat recombination induced by replication fork
668 defects in *Escherichia coli* requires a novel factor, RadC. *Genetics* 152: 5-13.
- 669 14. Michel B (2000) Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25:
670 173-178.

- 671 15. Lovett ST (2004) Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by
672 misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol* 52: 1243-1253.
- 673 16. Bzymek M, Lovett ST (2001) Evidence for two mechanisms of palindrome-stimulated
674 deletion in *Escherichia coli*: single-strand annealing and replication slipped
675 mispairing. *Genetics* 158: 527-540.
- 676 17. Nguyen HH, de la Tour CB, Toueille M, Vannier F, Sommer S, et al. (2009) The essential
677 histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid
678 compaction. *Mol Microbiol* 73: 240-252.
- 679 18. Meima R, Lidstrom ME (2000) Characterization of the minimal replicon of a cryptic
680 *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia*
681 *coli*-*D. radiodurans* shuttle vectors. *Appl Environ Microbiol* 66: 3856-3867.
- 682 19. Beam CE, Saveson CJ, Lovett ST (2002) Role for *radA/sms* in recombination
683 intermediate processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 6836-6844.
- 684 20. Cooper DL, Boyle DC, Lovett ST (2015) Genetic analysis of *Escherichia coli* RadA:
685 functional motifs and genetic interactions. *Mol Microbiol* 95: 769-779.
- 686 21. Konrad EB (1977) Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced
687 recombination between chromosomal duplications. *J Bacteriol* 130: 167-172.
- 688 22. Feinstein SI, Low KB (1986) Hyper-recombining recipient strains in bacterial
689 conjugation. *Genetics* 113: 13-33.
- 690 23. Washburn BK, Kushner SR (1991) Construction and analysis of deletions in the structural
691 gene (*uvrD*) for DNA helicase II of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 2569-2575.
- 692 24. Morel P, Hejna JA, Ehrlich SD, Cassuto E (1993) Antipairing and strand transferase
693 activities of *E. coli* helicase II (UvrD). *Nucleic Acids Res* 21: 3205-3209.
- 694 25. Veaute X, Delmas S, Selva M, Jeusset J, Le Cam E, et al. (2005) UvrD helicase, unlike
695 Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J*
696 24: 180-189.
- 697 26. Cox MM, Battista JR (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat*
698 *Rev Microbiol* 3: 882-892.
- 699 27. Treangen TJ, Abraham AL, Touchon M, Rocha EP (2009) Genesis, effects and fates of
700 repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol Rev* 33: 539-571.
- 701 28. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, et al. (2001) Genome of the
702 extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the
703 perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 44-79.
- 704 29. Marsin S, Mathieu A, Kortulewski T, Guerois R, Radicella JP (2008) Unveiling novel
705 RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS Genet* 4:
706 e1000146.
- 707 30. Bruand C, Bidnenko V, Ehrlich SD (2001) Replication mutations differentially enhance
708 RecA-dependent and RecA-independent recombination between tandem repeats in
709 *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 39: 1248-1258.
- 710 31. Thomas CA (1967) The recombination of DNA molecules. In: press TRU, editor. *The*
711 *Neurosciences A study program*. New York. pp. 162-182.
- 712 32. Lin FL, Sperle K, Sternberg N (1984) Model for homologous recombination during
713 transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process.
714 *Mol Cell Biol* 4: 1020-1034.
- 715 33. Mezard C, Nicolas A (1994) Homologous, homeologous, and illegitimate repair of
716 double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and a *rad52* mutant
717 strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 1278-1292.
- 718 34. Grimme JM, Honda M, Wright R, Okuno Y, Rothenberg E, et al. (2010) Human Rad52
719 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA
720 complexes. *Nucleic Acids Res* 38: 2917-2930.

- 721 35. Rothenberg E, Grimme JM, Spies M, Ha T (2008) Human Rad52-mediated homology
722 search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping
723 nucleoprotein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20274-20279.
- 724 36. Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand
725 breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404.
- 726 37. Sugiman-Marangos S, Junop MS (2010) The structure of DdrB from *Deinococcus*: a new
727 fold for single-stranded DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res* 38: 3432-3440.
- 728 38. Sugiman-Marangos SN, Peel JK, Weiss YM, Ghirlando R, Junop MS (2013) Crystal
729 structure of the DdrB/ssDNA complex from *Deinococcus radiodurans* reveals a DNA
730 binding surface involving higher-order oligomeric states. *Nucleic Acids Res* 41: 9934-
731 9944.
- 732 39. Shinohara A, Shinohara M, Ohta T, Matsuda S, Ogawa T (1998) Rad52 forms ring
733 structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells* 3:
734 145-156.
- 735 40. Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski SC (1998) DNA annealing by RAD52 protein is
736 stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and
737 single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6049-6054.
- 738 41. Lockhart JS, DeVeaux LC (2013) The essential role of the *Deinococcus radiodurans* *ssb*
739 gene in cell survival and radiation tolerance. *PLoS One* 8: e71651.
- 740 42. Shereda RD, Kozlov AG, Lohman TM, Cox MM, Keck JL (2008) SSB as an
741 organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*
742 43: 289-318.
- 743 43. Inoue J, Honda M, Ikawa S, Shibata T, Mikawa T (2008) The process of displacing the
744 single-stranded DNA-binding protein from single-stranded DNA by RecO and RecR
745 proteins. *Nucleic Acids Res* 36: 94-109.
- 746 44. Hobbs MD, Sakai A, Cox MM (2007) SSB protein limits RecOR binding onto single-
747 stranded DNA. *J Biol Chem* 282: 11058-11067.
- 748 45. Reams AB, Kofoed E, Duleba N, Roth JR (2014) Recombination and annealing pathways
749 compete for substrates in making *rrn* duplications in *Salmonella enterica*. *Genetics*
750 196: 119-135.
- 751 46. Atkinson J, McGlynn P (2009) Replication fork reversal and the maintenance of genome
752 stability. *Nucleic Acids Res* 37: 3475-3492.
- 753 47. Bierne H, Seigneur M, Ehrlich SD, Michel B (1997) *uvrD* mutations enhance tandem
754 repeat deletion in the *Escherichia coli* chromosome via SOS induction of the RecF
755 recombination pathway. *Mol Microbiol* 26: 557-567.
- 756 48. Zieg J, Maples VF, Kushner SR (1978) Recombinant levels of *Escherichia coli* K-12
757 mutants deficient in various replication, recombination, or repair genes. *J Bacteriol*
758 134: 958-966.
- 759 49. Arthur HM, Lloyd RG (1980) Hyper-recombination in *uvrD* mutants of *Escherichia coli*
760 K-12. *Mol Gen Genet* 180: 185-191.
- 761 50. Ossanna N, Mount DW (1989) Mutations in *uvrD* induce the SOS response in *Escherichia*
762 *coli*. *J Bacteriol* 171: 303-307.
- 763 51. Yancey-Wrona JE, Wood ER, George JW, Smith KR, Matson SW (1992) *Escherichia*
764 *coli* Rep protein and helicase IV. Distributive single-stranded DNA-dependent
765 ATPases that catalyze a limited unwinding reaction *in vitro*. *Eur J Biochem* 207: 479-
766 485.
- 767 52. Guy CP, Atkinson J, Gupta MK, Mahdi AA, Gwynn EJ, et al. (2009) Rep provides a
768 second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA. *Mol*
769 *Cell* 36: 654-666.

- 770 53. Atkinson J, Gupta MK, McGlynn P (2011) Interaction of Rep and DnaB on DNA. *Nucleic*
771 *Acids Res* 39: 1351-1359.
- 772 54. Lane HE, Denhardt DT (1975) The *rep* mutation. IV. Slower movement of replication
773 forks in *Escherichia coli rep* strains. *J Mol Biol* 97: 99-112.
- 774 55. Taucher-Sholz G, Abdel-Monem M, Hoffman-Berling H (1983) Function of DNA
775 helicases in *E. coli*. In: Cozarelli NR, editor. *Mechanisms of DNA replication and*
776 *recombination*: Alan, R. Liss, Inc., New York. pp. 65-76.
- 777 56. Boubakri H, de Septenville AL, Viguera E, Michel B (2010) The helicases DinG, Rep and
778 UvrD cooperate to promote replication across transcription units *in vivo*. *EMBO J* 29:
779 145-157.
- 780 57. Flores MJ, Bidnenko V, Michel B (2004) The DNA repair helicase UvrD is essential for
781 replication fork reversal in replication mutants. *EMBO Rep* 5: 983-988.
- 782 58. Flores MJ, Sanchez N, Michel B (2005) A fork-clearing role for UvrD. *Mol Microbiol* 57:
783 1664-1675.
- 784 59. Jiao J, Wang L, Xia W, Li M, Sun H, et al. (2012) Function and biochemical
785 characterization of RecJ in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 11: 349-
786 356.
- 787 60. Montelone BA, Malone RE (1994) Analysis of the rad3-101 and rad3-102 mutations of
788 *Saccharomyces cerevisiae*: implications for structure/function of Rad3 protein. *Yeast*
789 10: 13-27.
- 790 61. Daly MJ, Ling O, Minton KW (1994) Interplasmidic recombination following irradiation
791 of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 176: 7506-7515.
- 792 62. Daly MJ, Minton KW (1995) Interchromosomal recombination in the extremely
793 radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 177: 5495-5505.
- 794 63. Daly MJ, Minton KW (1996) An alternative pathway of recombination of chromosomal
795 fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium
796 *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 178: 4461-4471.
- 797 64. Repar J, Cvjetan S, Slade D, Radman M, Zahradka D, et al. (2010) RecA protein assures
798 fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair*
799 (Amst) 9: 1151-1161.
- 800 65. Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, et al. (2000) The
801 importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404: 37-41.
- 802 66. Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and
803 bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 751-813, table of contents.
- 804 67. Kuzminov A (1995) Instability of inhibited replication forks in *E. coli*. *Bioessays* 17: 733-
805 741.
- 806 68. Michel B, Ehrlich SD, Uzest M (1997) DNA double-strand breaks caused by replication
807 arrest. *EMBO J* 16: 430-438.
- 808 69. Meima R, Rothfuss HM, Gewin L, Lidstrom ME (2001) Promoter cloning in the
809 radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 183: 3169-3175.
- 810 70. Bonacossa de Almeida C, Coste G, Sommer S, Bailone A (2002) Quantification of RecA
811 protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its
812 regulation. *Mol Genet Genomics* 268: 28-41.
- 813 71. Menecier S, Coste G, Servant P, Bailone A, Sommer S (2004) Mismatch repair ensures
814 fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus*
815 *radiodurans*. *Mol Genet Genomics* 272: 460-469.
- 816 72. Bentchikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2007) Additive effects of SbcCD and PolX
817 deficiencies in the *in vivo* repair of DNA double strand breaks in *Deinococcus*
818 *radiodurans*. *J Bacteriol*.

- 819 73. Devigne A, Ithurbide S, Bouthier de la Tour C, Passot F, Mathieu M, et al. (2015) DdrO is
820 an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-
821 like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. Mol
822 Microbiol.
- 823 74. Satoh K, Kikuchi M, Ishaque AM, Ohba H, Yamada M, et al. (2012) The role of
824 *Deinococcus radiodurans* RecFOR proteins in homologous recombination. DNA
825 Repair (Amst) 11: 410-418.
- 826 75. Dunn OJ (1964) Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics 6: 241-252.
827
828
829

830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873

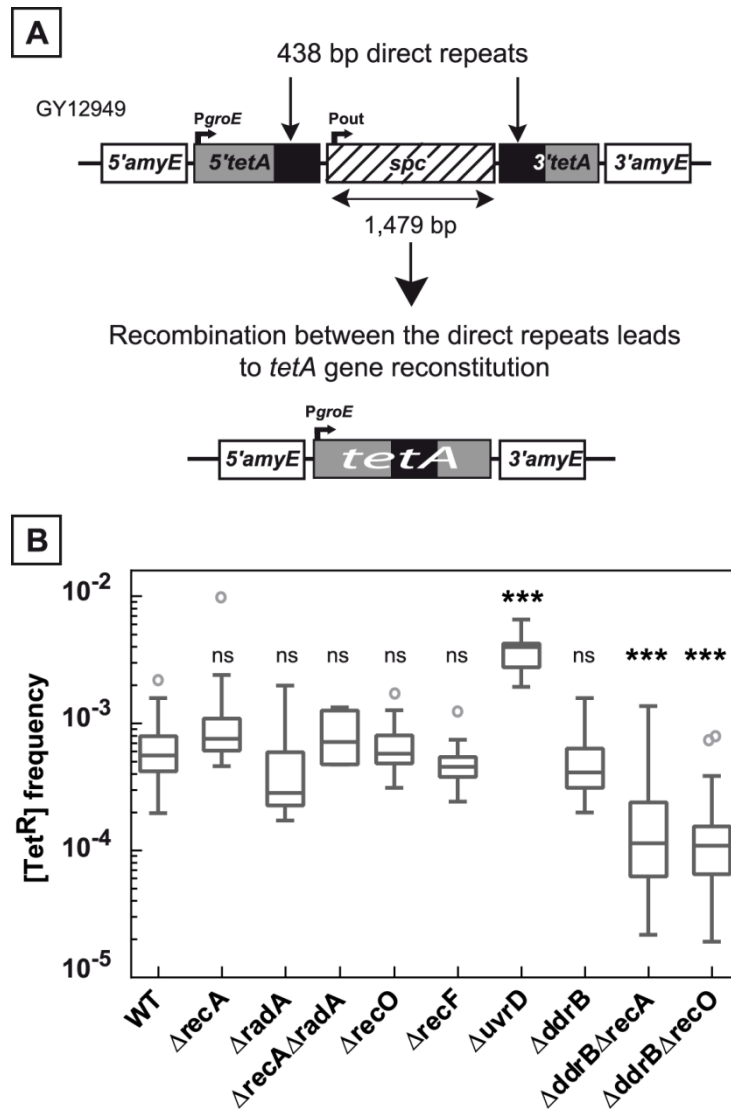


Fig 1. Deletion frequency between repeated sequences depends on the genetic context. A. Schematic representation of the genetic recombination assay. The 5' and 3' parts of the *tetA* gene, containing 438 bp repeats (black boxes) separated by an intervening sequence of 1,479 bp encoding a *spc* gene conferring resistance to spectinomycin, were introduced into the dispensable *amyE* gene locus. Recombination between the repeats leads to the *tetA* gene reconstitution conferring tetracycline resistance to bacteria. **B.** Medians of [Tet^R] frequencies in WT (GY12949), $\Delta recA$ (GY15184), $\Delta radA$ (GY12956), $\Delta recA\Delta radA$ (GY12971), $\Delta recO$ (GY12963), $\Delta recF$ (GY12955), $\Delta uvrD$ (GY12953), $\Delta ddrB$ (GY16016), $\Delta ddrB \Delta recA$ (GY16628), and $\Delta ddrB \Delta recO$ (GY16638) mutant strains are represented by Tukey box plots. Outliers are represented by open circles. Medians were calculated from 12 to 53 independent values (except for medians calculated from at least 4 independent values in $\Delta radA$ and $\Delta recA \Delta radA$ bacteria). Statistically significant differences in the medians of recombination frequencies of the mutants, compared to those observed in strain GY12949, were calculated using the non-parametric Dunn's multiple comparison test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns if $P > 0.05$.

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

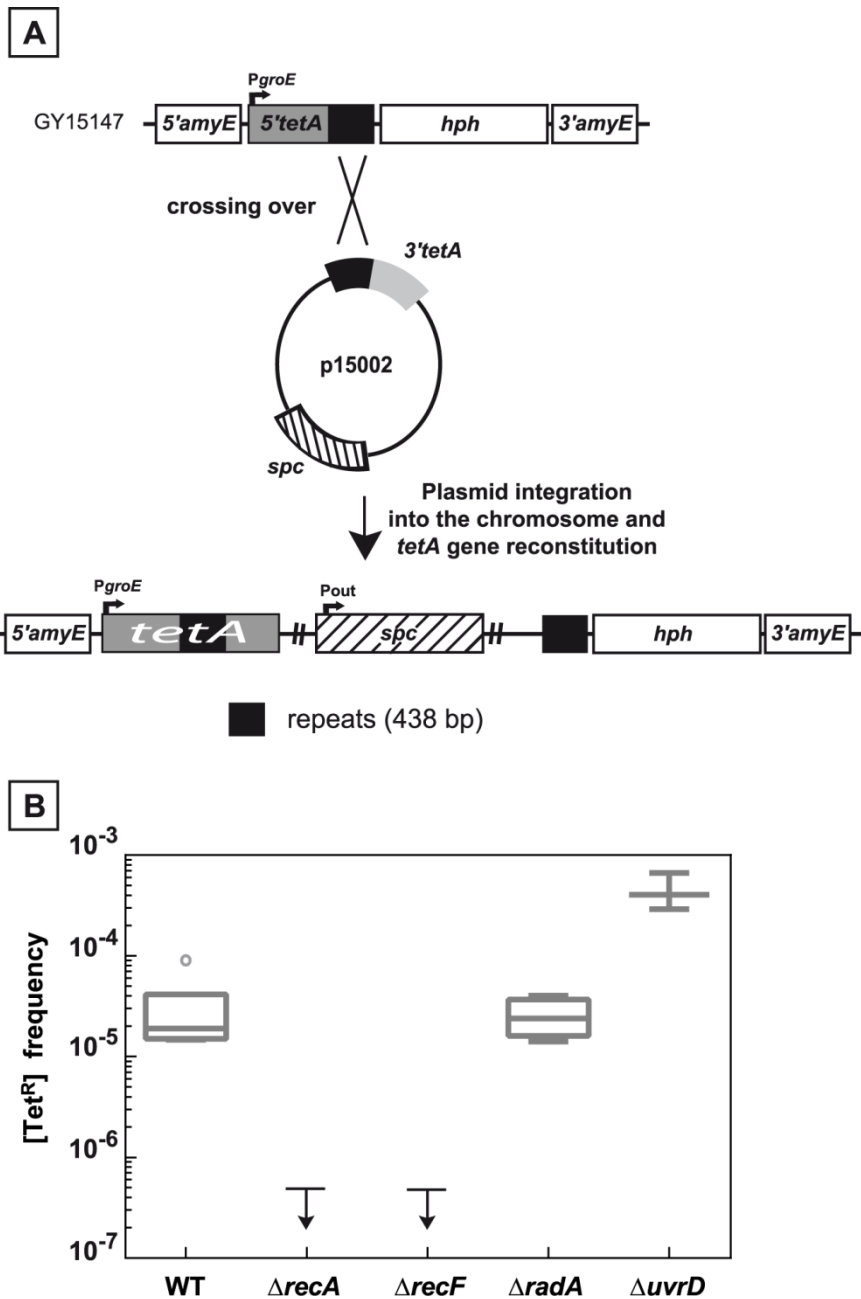


Fig 2. Recombination between chromosomal and plasmid DNA is RecA- and RecF-dependent.

A. Schematic representation of the recombination assay between chromosomal and plasmid DNA. The 5'tetA and the 3'tetA regions of the tetA gene, containing 438 bp repeats, were introduced into the chromosomal dispensable amyE gene and into the p11554 plasmid giving rise to plasmid p15002, respectively. One crossing over between the two 438 bp repeated sequences (black boxes) leads to the reconstitution of a functional tetA gene and the integration of the plasmid into chromosomal DNA. **B.** Medians of [Tet^R] frequencies in WT (GY15147), Δ*recA* (GY15158), Δ*recF* (GY15160), Δ*radA* (GY15149), and Δ*uvrD* (GY15156) bacteria, all containing the p15002 plasmid, are calculated from at least 3 independent values and represented by Tukey boxplots. Outliers are represented by open circles. The small arrows attached to the horizontal line representing the upper limit of

920 detectable [Tet^R] frequencies indicate that [Tet^R] frequencies were $< 5 \cdot 10^{-7}$ for $\Delta recA$ and
921 $\Delta recF$ bacteria.
922

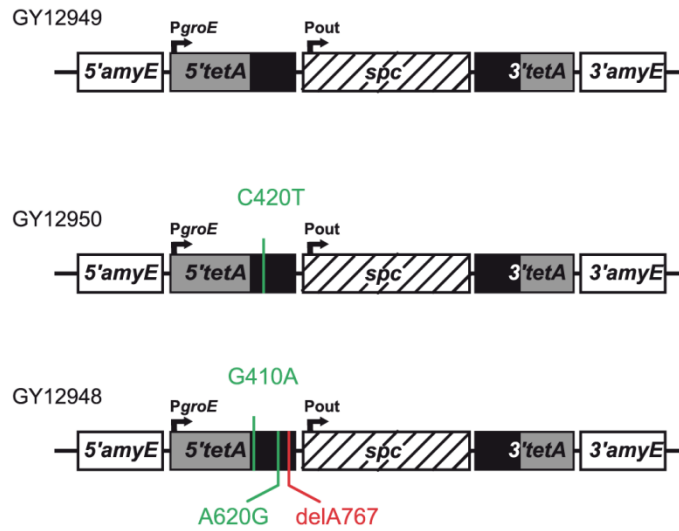
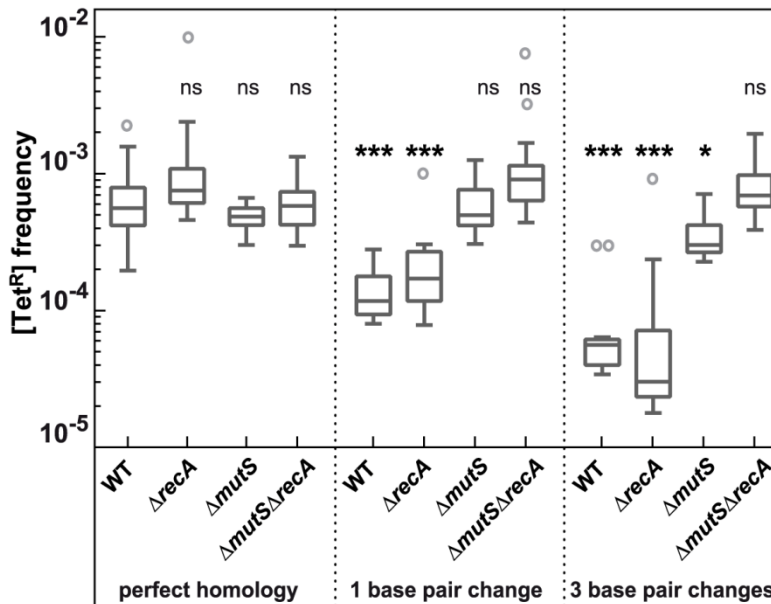
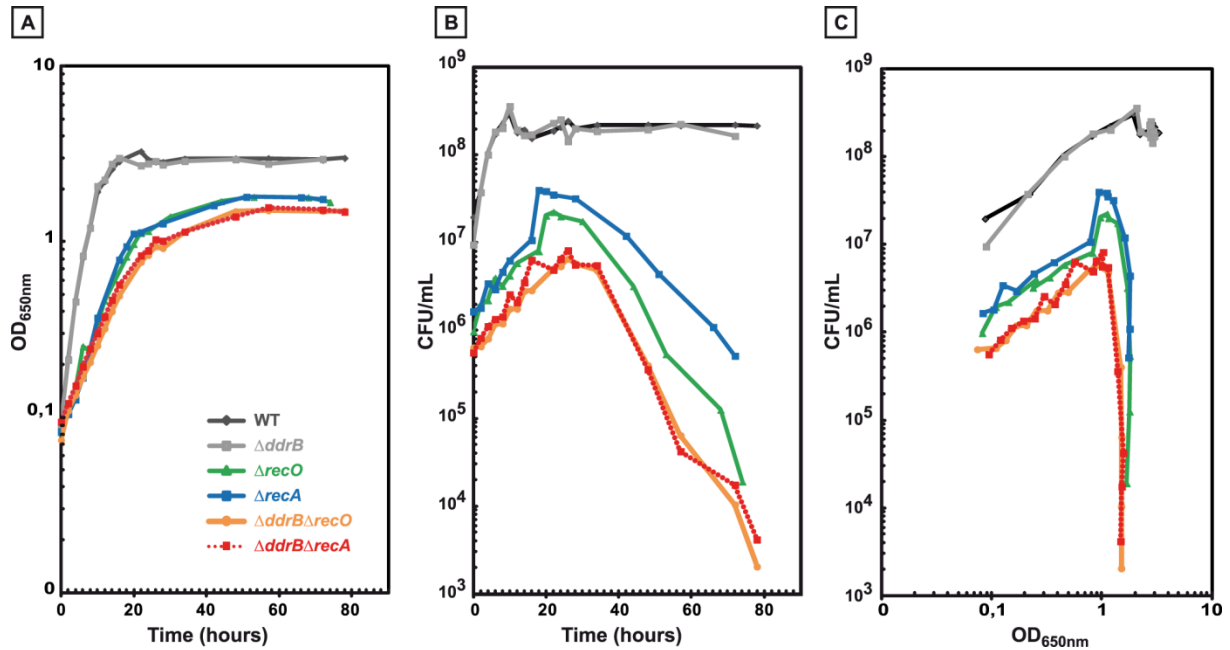
A**B**

Fig 3. Effect of base pair changes in the repeats on their recombination frequencies.

A. Schematic representation of the recombination substrates containing 1 or 3 bp changes. The positions of the base pair changes calculated from the initiation codon in the 5' *tetA* region are indicated. **B.** Medians of [Tet^R] frequencies calculated from 14 to 43 independent values in WT (GY12949), $\Delta recA$ (GY15184), $\Delta mutS$ (GY12978), $\Delta mutS \Delta recA$ (GY16620) bacteria containing identical repeated sequences, WT (GY12950), $\Delta recA$ (GY16624), $\Delta mutS$ (GY12980), $\Delta mutS \Delta recA$ (GY16618) containing one base difference in the repeated sequences, and WT (GY12948), $\Delta recA$ (GY16622), $\Delta mutS$ (GY12979), $\Delta mutS \Delta recA$ (GY16616) containing 3 base differences in the repeated sequences, are represented by Tukey boxplots. Outliers are represented by open circles. Statistically significant differences in the medians of recombination frequencies of the mutants and WT containing sequence differences in the repeated sequence compared to GY12949 were calculated using the non-parametric Dunn's multiple comparison test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns if $P > 0.05$.

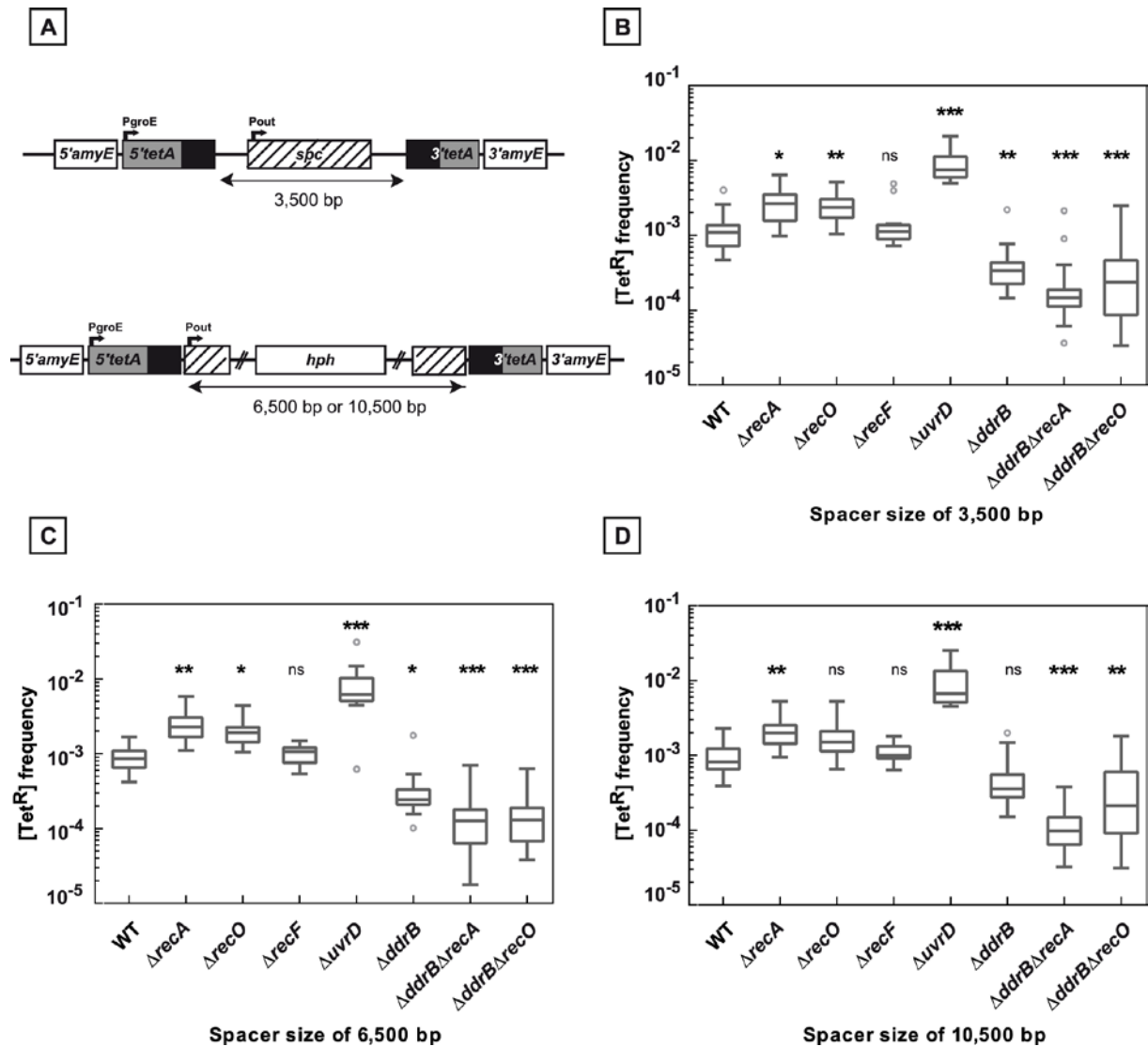
973
974
975
976
977
978
979



980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994

Fig 4. Impaired growth and stationary-phase lethality of recombination-deficient mutant cells.

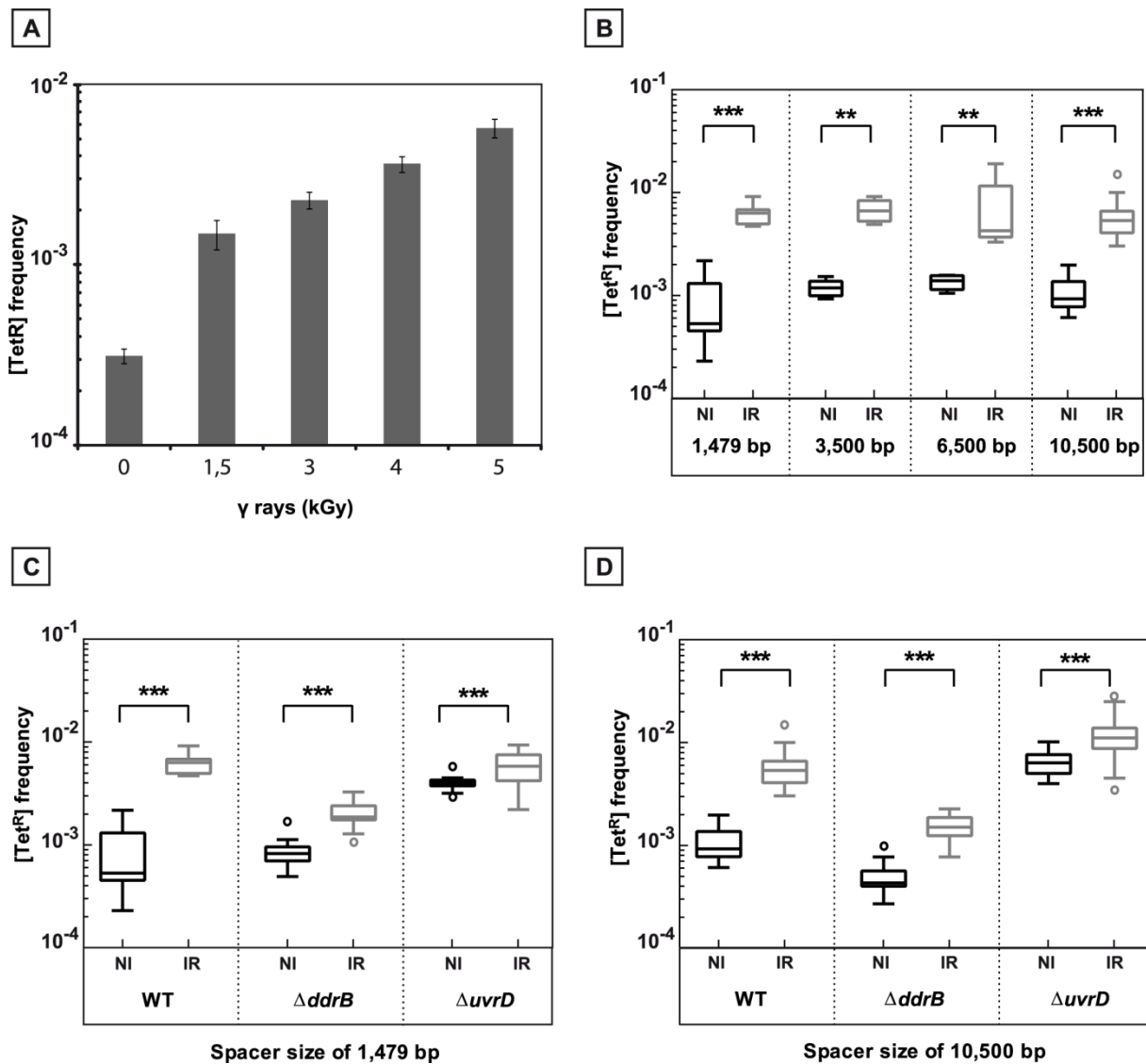
GY9613 (WT) (black diamonds), GY13915 ($\Delta ddrB$) (grey squares), GY15125 ($\Delta recO$) (green triangles), GY12968 ($\Delta recA$) (blue squares), GY16626 ($\Delta ddrB \Delta recA$) (red squares and interrupted lines), GY16636 ($\Delta ddrB \Delta recO$) (orange circles) were grown from independent colonies at 30°C to an OD_{650nm} = 0.1 (time 0 of the growth curves). **A.** OD_{650nm} as a function of time. **B.** Colony forming units as a function of time. **C.** Colony forming units as a function of OD_{650nm}.



995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015

Fig 5. Deletion frequencies between repeated sequences separated by 3,500, 6,500, and 10,500 bp.

A. Schematic representation of the constructions used. **B., C., D.** Bacteria contain 3,500 bp (panel B), 6,500 bp (panel C), and 10,500 bp (panel D) intervening sequences between the *tetA* repeats. The medians of [Tet^R] frequencies calculated from 10 to 35 independent values in the tested strains are represented by Tukey boxplots. Outliers are represented by open circles. Statistically significant differences in the medians of recombination frequencies of the mutants compared to the WT GY16209, GY16227, and GY16235 in panel B, C, and D, respectively, were calculated using the non-parametric Dunn's multiple comparison test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; (ns) if $P > 0.05$. **B.** WT (GY16209), $\Delta recA$ (GY16238), $\Delta recO$ (GY16262), $\Delta recF$ (GY16264), $\Delta uvrD$ (GY16608), $\Delta ddrB$ (GY16268), $\Delta ddrB \Delta recA$ (GY16630), $\Delta ddrB \Delta recO$ (GY16640) **C.** WT (GY16227), $\Delta recA$ (GY16244), $\Delta recO$ (GY16278), $\Delta recF$ (GY16276), $\Delta uvrD$ (GY16612), $\Delta ddrB$ (GY16282), $\Delta ddrB \Delta recA$ (GY16632), $\Delta ddrB \Delta recO$ (GY16642) **D.** WT (GY16235), $\Delta recA$ (GY16252), $\Delta recO$ (GY16290), $\Delta recF$ (GY16292), $\Delta uvrD$ (GY16614), $\Delta ddrB$ (GY16296), $\Delta ddrB \Delta recA$ (GY16634), $\Delta ddrB \Delta recO$ (GY16644).



1016

1017 **Fig 6. γ -irradiation induced recombination between repeated sequences.** **A.** Induction of
 1018 recombination between repeated sequences separated by 1,479 bp as a function of the
 1019 radiation dose. [Tet^R] frequencies were measured in at least 5 independent cultures after 20
 1020 hours of post irradiation incubation of GY12949 in TGY medium after exposure to different
 1021 γ -irradiation doses. **B.** Induction by exposure to γ -irradiation of recombination between
 1022 repeats separated by intervening sequences of increasing length: 1,479 bp (GY12949), 3,500
 1023 bp (GY16209), 6,500 bp (GY16227) and 10,500 bp (GY16235). **C.** γ -promoted induction of
 1024 recombination between overlapping sequences separated by 1,479 bp in WT (GY12949),
 1025 $\Delta ddrB$ (GY16016), and $\Delta uvrD$ (GY12953) bacteria. **D.** γ -promoted induction of
 1026 recombination between overlapping sequences separated by 10,500 bp in WT (GY16235),
 1027 $\Delta ddrB$ (GY16296), $\Delta uvrD$ (GY16614). **B., C., D.** Medians of the [Tet^R] frequencies calculated
 1028 from 5 to 30 independent values are represented by Tukey boxplots. Outliers were represented
 1029 by open circles. Statistically significant differences in the medians of recombination
 1030 frequencies between irradiated and the corresponding non-irradiated bacteria were calculated
 1031 using the non-parametric Mann-Whitney test: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; (ns) if
 1032 P > 0.05. NI: non-irradiated bacteria. IR: irradiated bacteria.

1033

1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067

Supporting information

Fig S1. Integration of plasmid DNA in chromosomal DNA verified by PCR in [Tet^R] bacteria. **A.** Schematic representation of the position of the primer pairs a and b, a and d, c and d, and e and f, used to test the integration of the plasmid in chromosomal DNA **B.** GY15147 bacteria containing a 5' *tetA* region inserted in the *amyE* gene and a 3' *tetA* region carried by plasmid p15002 were plated on TGY-Agar plates with or without tetracycline. The genomic DNA of 3 independent [Tet^R] colonies picked and purified on TGY-Agar plates containing 2.5 µg / mL tetracycline and 1 [Tet^S] colony picked on TGY-Agar plates was purified and used as templates to verify by PCR the integration of the plasmid using the primers pairs described in Fig. S1A. Purified p15002 plasmid DNA and genomic DNA of strain GY15102 that does not contain plasmid p15002 were used as controls. PCR fragment sizes are presented for each DNA template. The fragment of 9812 bp was not amplified under the conditions we used for PCR amplification.

Fig S2. Linear regression models of the evolution of the [Tet^R] bacteria frequencies as a function of the number of base pair changes in one of the repeat in WT, $\Delta recA$, $\Delta mutS$ and $\Delta mut \Delta recA$ strains.

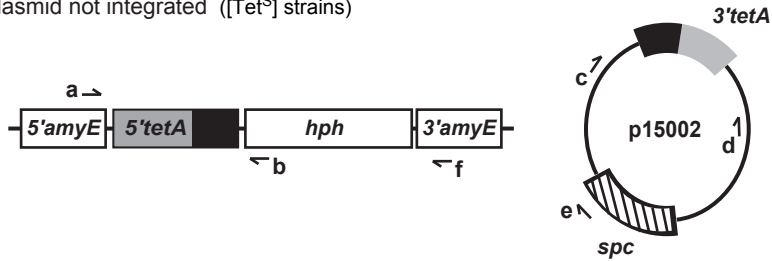
Fig S3. Non-homogenotization of $\Delta recA$, $\Delta recF$ and $\Delta recR$ deletions in $\Delta uvrD$ bacteria. **A.** Diagnostic PCRs for the deletion of *recA* and *uvrD* genes. **B.** Diagnostic PCRs for the deletion of *recF* and *uvrD* genes. **C.** Diagnostic PCRs for the deletion of *recR* and *uvrD* genes. Schematic allelic replacement, primers and PCR fragment sizes are represented for each gene.

Fig S4. Homogenotization of $\Delta recA$ and $\Delta recO$ deletions in $\Delta ddrB$ bacteria. **A.** Diagnostic PCRs for the deletion of *recA* and *ddrB* genes. **B.** Diagnostic PCRs for the deletion of *recO* and *ddrB* genes. Schematic allelic replacement, primers and PCR fragment sizes are represented for each gene.

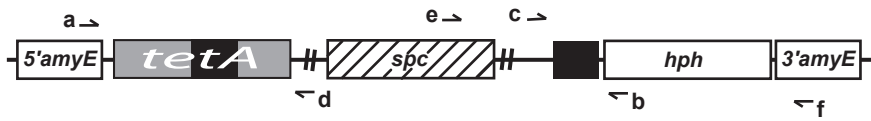
Figure S1

A

Plasmid not integrated ([Tet^S] strains)



Plasmid integrated into the chromosome after recombination between the repeats ([Tet^R] strains)



B

	PCR ab	PCR cd	PCR ad	PCR ef
Plasmid not integrated	1226 bp	1312 bp	no PCR product	no PCR product
Plasmid integrated	9812 bp	no PCR product	1752 bp	3478 bp
GY15102	1226 bp	no PCR product	no PCR product	no PCR product
p15002	no PCR product	1312 bp	no PCR product	no PCR product

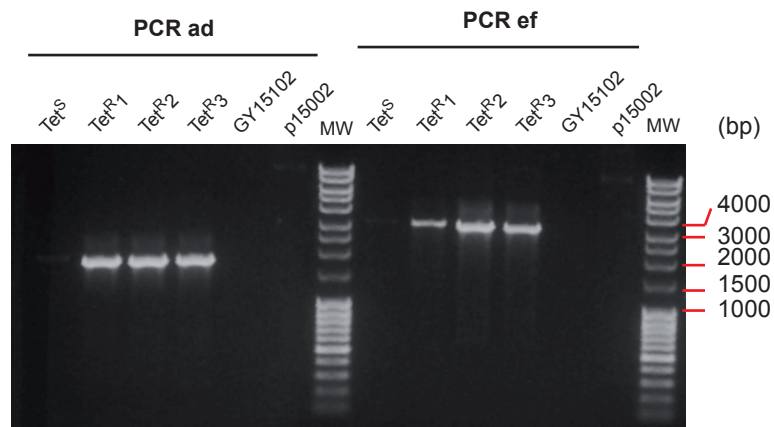
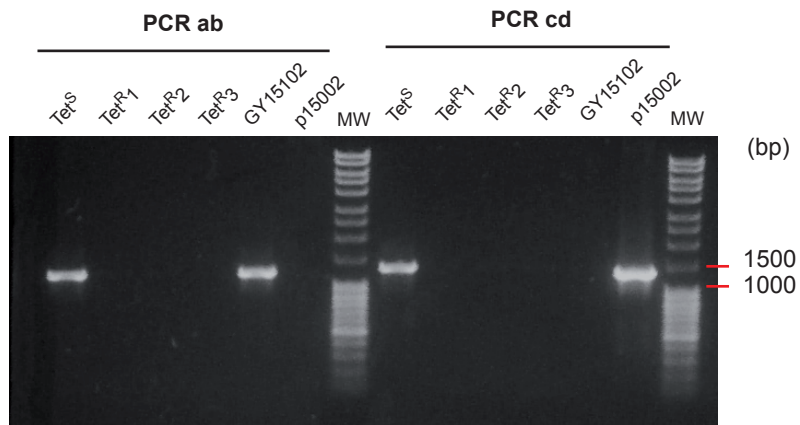


Figure S2

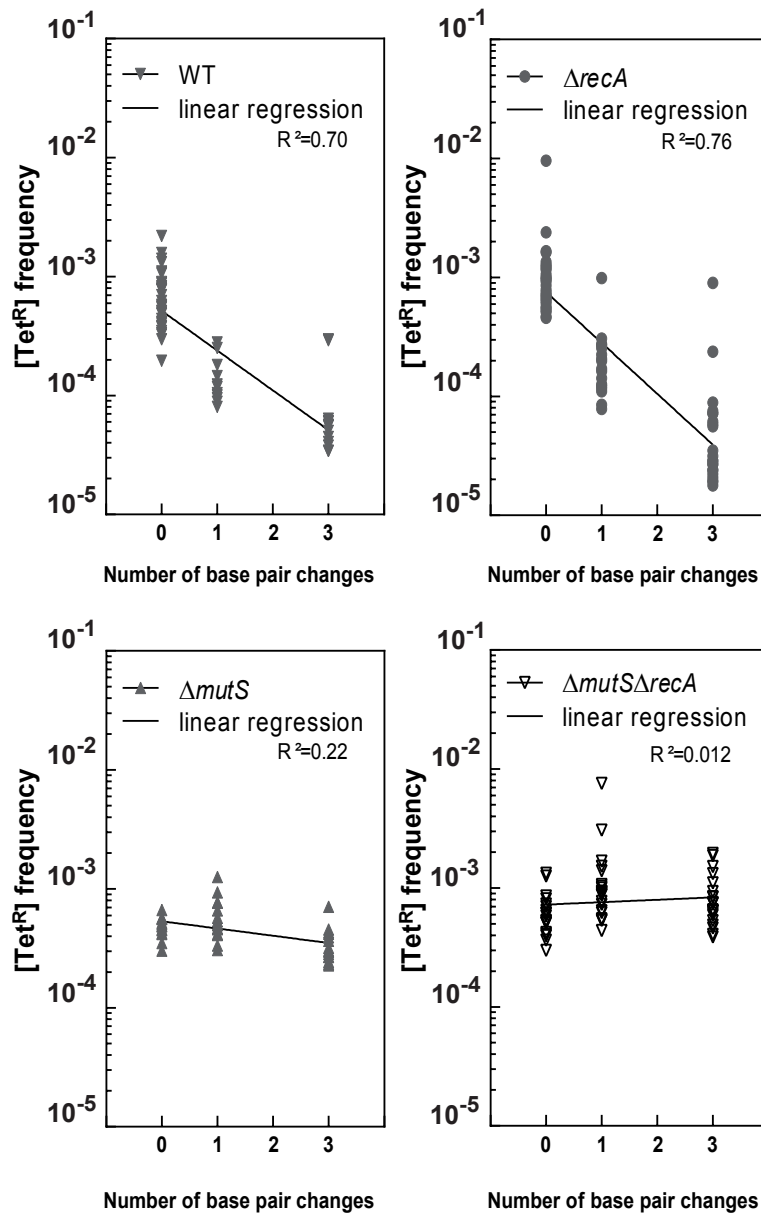
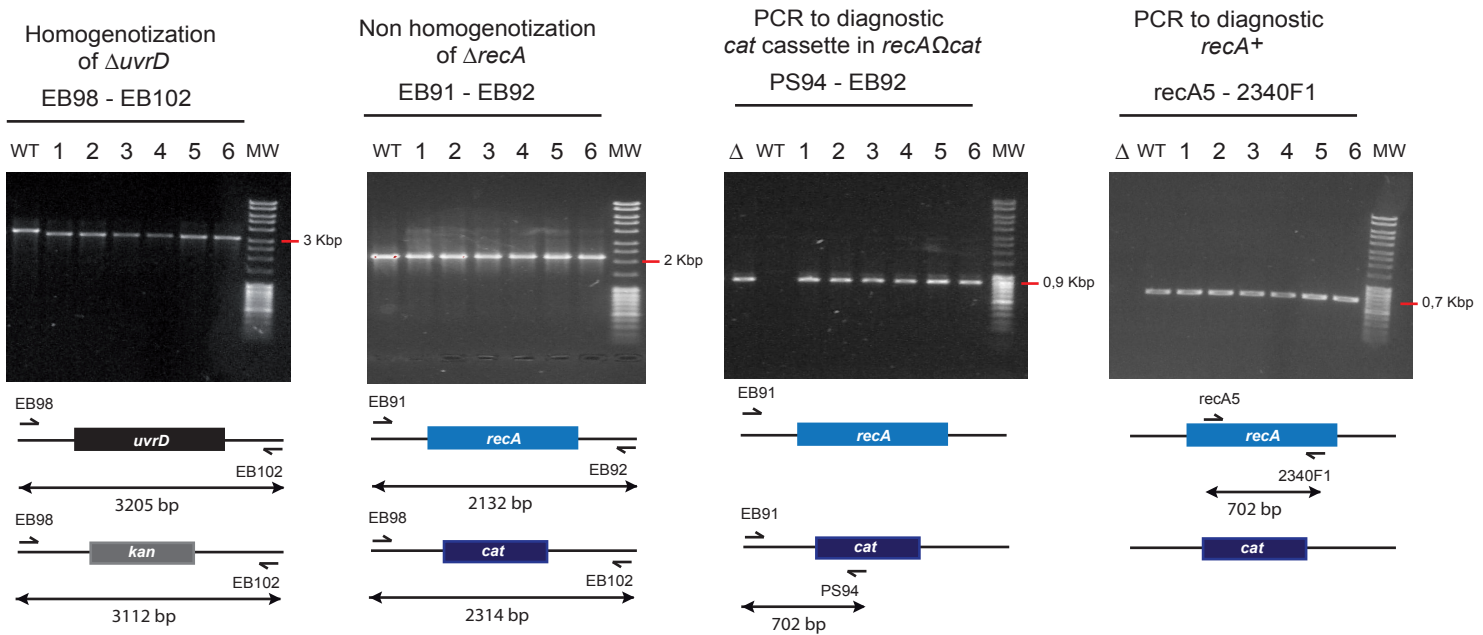
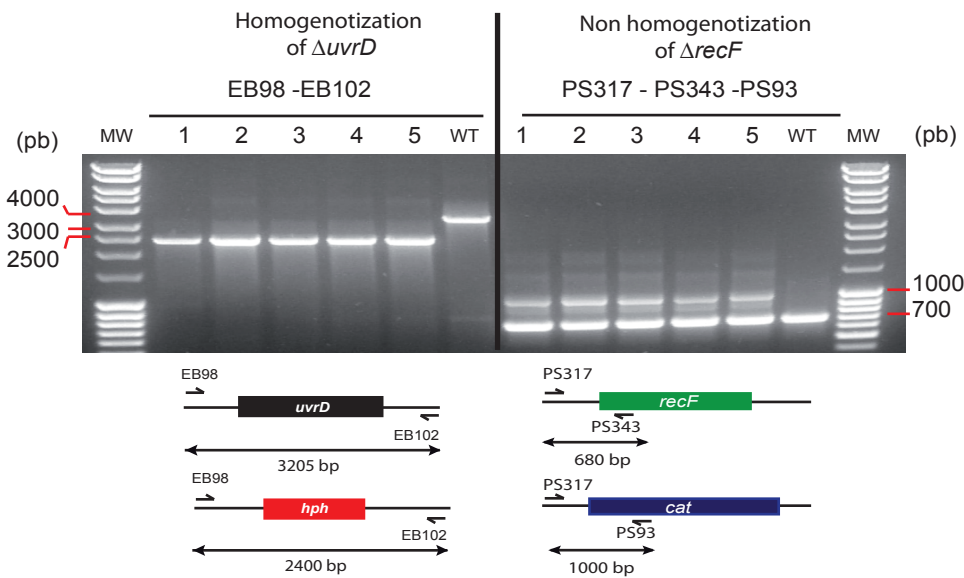


Figure S3

A Diagnostic PCR for double mutants $\Delta uvrD\Delta recA$ construction



B Diagnostic PCR for double mutants $\Delta uvrD\Delta recF$ construction



C Diagnostic PCR for double mutants $\Delta uvrD\Delta recR$ construction

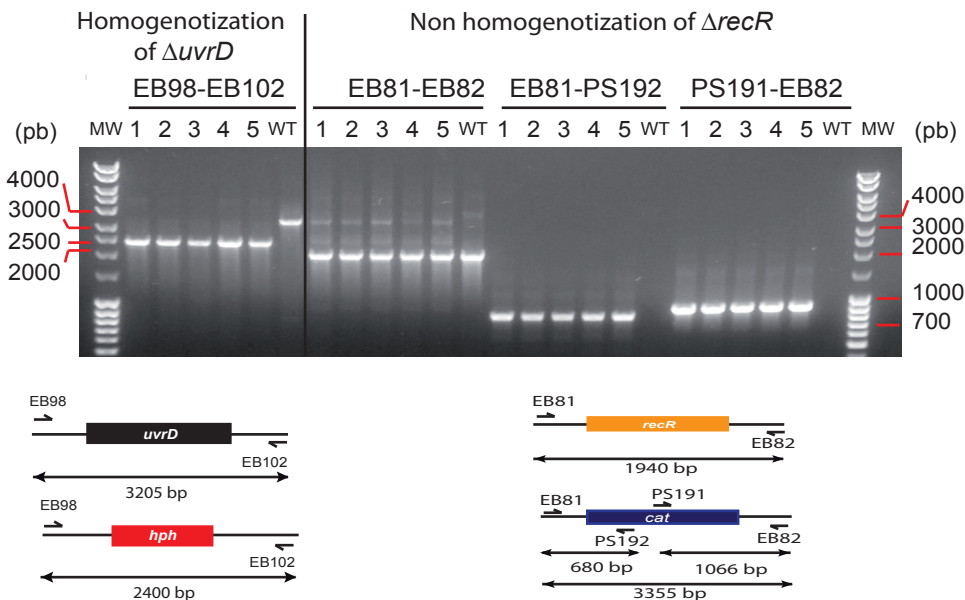
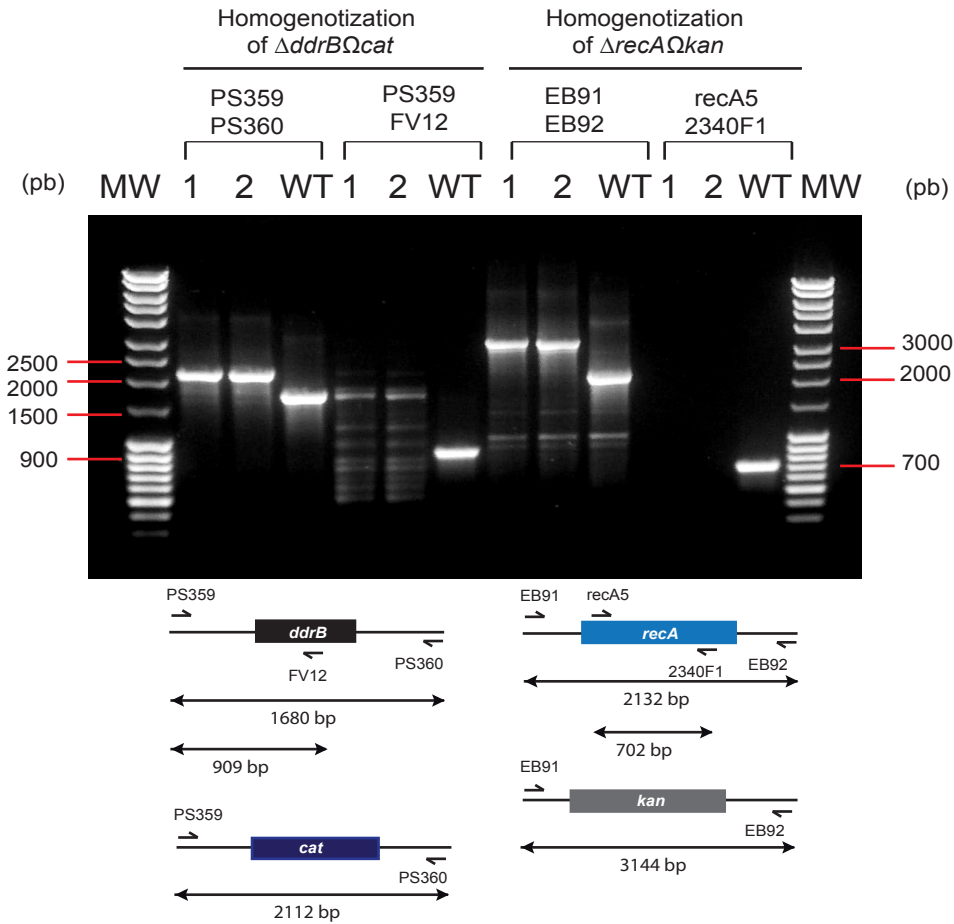
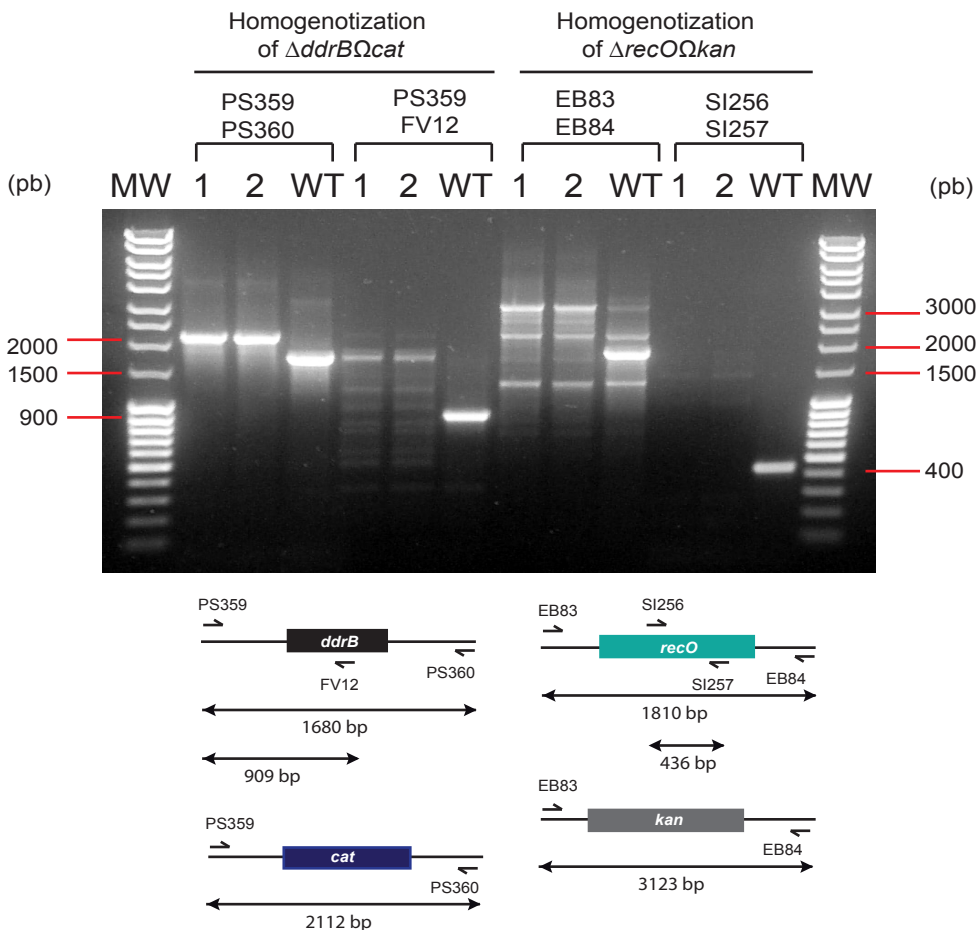


Figure S4

A Diagnostic PCR for $\Delta ddrB\Delta recA$ mutants



B Diagnostic PCR for $\Delta ddrB\Delta recO$ mutants



III. Résultats complémentaires

1. Tentative de construction d'un mutant $\Delta ruvC$

Afin de tester si la résolvasse RuvC est impliquée dans la prise en charge de fourches de réplication arrêtées chez *D. radiodurans*, j'ai tenté dans un premier temps de construire une souche en remplaçant le gène *ruvC* par une cassette de résistance au chloramphénicol par la technique de ligation tripartite. Les transformants résistants au chloramphénicol obtenus ont ensuite été striés 4 fois sur milieu sélectif afin d'obtenir des souches homozygotes. L'ADN des cellules a été extrait et l'homogénéisation des souches a été vérifiée par PCR en utilisant des oligonucléotides permettant de différencier l'information sauvage de l'information mutante (Figure 48). Même après 4 stries sur milieu sélectif, on observe sur le gel des produits de PCR (Figure 48) que les 5 clones testés possèdent encore l'information sauvage et ne sont donc pas homozygotes. La persistance de l'information sauvage chez tous les clones testés après plusieurs stries est un argument en faveur d'un rôle important du gène pour la viabilité des cellules suggérant qu'il est donc impossible d'obtenir des souches homozygotes.

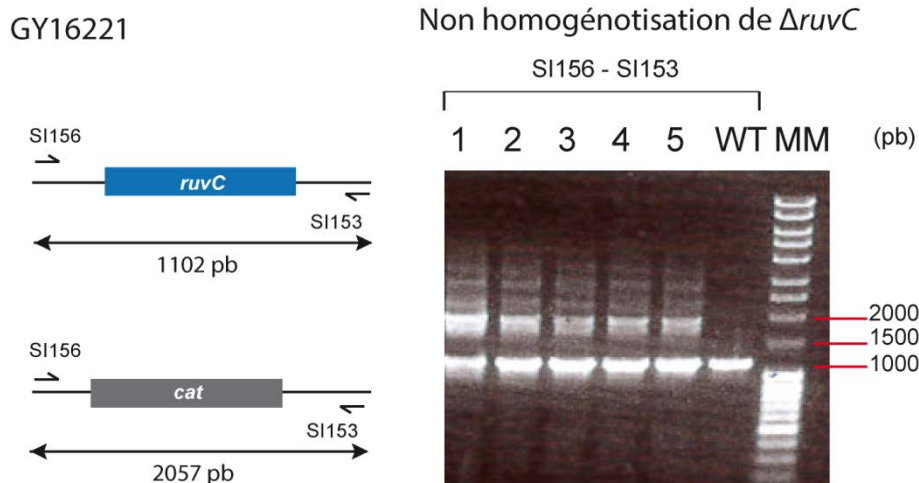
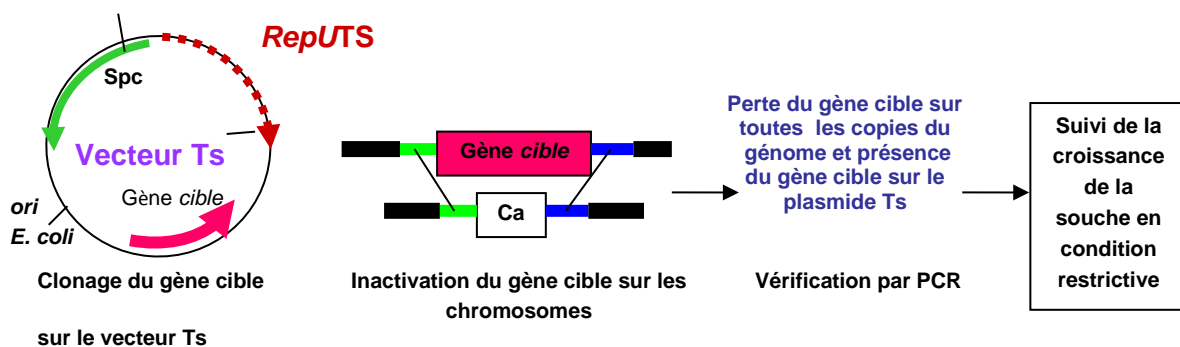


Figure 48 : Non homogénéisation de la souche GY16221 $\Delta ruvC$.

Schéma des oligonucléotides utilisés pour tester le génotype des 5 clones testés par PCR et tailles attendues des produits PCR (à gauche). Migration des fragments produits par PCR (à droite). Tous les clones testés sont hétérozygotes.

2. Test génétique de l'essentialité du gène *ruvC*

Un système génétique qui permet de tester l'essentialité des gènes chez *D. radiodurans* a été mis au point et utilisé au laboratoire (Nguyen *et al.*, 2009 , Devigne *et al.*, 2015). Le principe du test (Figure 49) repose sur le clonage du gène d'intérêt dans un vecteur à réplication thermosensible et sur l'inactivation du gène sur toutes les copies de chromosomes en le remplaçant par une cassette de résistance à un antibiotique. Si le gène étudié joue un rôle important dans la viabilité de cellules, les cellules ne seront pas viables ou montreront des défauts de croissance à 37°C, température non permissive pour la réplication du plasmide thermosensible. L'expérience a été faite pour tester l'essentialité du gène *ruvC* en prenant pour témoins le gène *amyE* non essentiel, codant l'amylase, et le gène *hbs* qui code la protéine HU, protéine majeure impliquée dans la compaction du nucléoïde et qui est essentielle à la viabilité de la cellule chez *D. radiodurans* (Nguyen *et al.*, 2009).



	Gène essentiel	Gène non essentiel
Cellules ayant gardé le plasmide (28°C) :	viables	viables
Cellules ayant perdu le plasmide (37°C) :	non viables, défaut de croissance	viables

Figure 49 : Principe du test d'essentialité des gènes.

Le gène *ruvC* a été cloné sous le contrôle du promoteur Pspac dans le plasmide p13841, qui est un plasmide à répllication thermosensible chez *D. radiodurans* donnant naissance au plasmide p15016. La souche sauvage de *D. radiodurans* a été transformée par le plasmide pour obtenir la souche GY16401 (sauvage / p15016 (*ruvC*⁺)) à partir de laquelle des cellules compétentes ont été préparées. Ces cellules ont été transformées par de l'ADN génomique provenant de la souche GY16221 contenant la délétion du gène *ruvC* sur une partie des copies chromosomiques et les transformants ont été sélectionnés pour leur résistance au chloramphénicol. Les clones recombinants obtenus sont striés successivement deux fois sur un milieu contenant de la spectinomycine (maintien du plasmide) et du chloramphénicol afin d'obtenir des souches homozygotes. La présence de la délétion sur toutes les copies des chromosomes est vérifiée par PCR (Figure 50). Le gène *ruvC* a été inactivé sur toutes les copies de chromosome par remplacement allélique du gène *ruvC* par la cassette conférant la résistance au chloramphénicol dans la souche GY16403 exprimant le gène *ruvC* à partir du plasmide à répllication thermosensible.

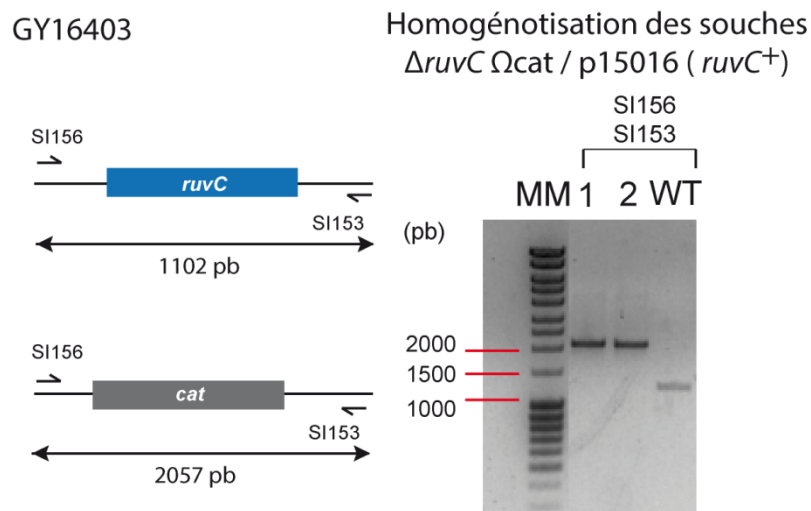


Figure 50 : Homogénéisation de la souche GY16403 $\Delta ruvC \Omega cat / p15016 (ruvC^+)$.

Schéma des oligonucléotides utilisés pour tester le génotype des 5 clones testés par PCR et tailles des produits PCR attendues (à gauche). Migration des fragments produits par PCR (à droite). Tous les clones testés sont homozygotes, toutes les copies du gène *ruvC* étant remplacées par la cassette *cat*.

Des tests en goutte ont ensuite été effectués à partir de cultures à 30°C, température permissive pour la réplication du plasmide sur des boîtes contenant ou non de la spectinomycine. Ces boîtes sont incubées à 30°C (maintien du plasmide) ou 37°C (perte du plasmide). Plusieurs souches témoins sont testées en parallèle (Figure 51) : (i) une souche sauvage contenant un plasmide à réplication non thermosensible (GY13739 : wt /*prepU*), (ii) une souche sauvage contenant le plasmide thermosensible p13840 (GY13746 : wt/*prepUTs*), (iii) une souche n'exprimant le gène *amyE*, non essentiel, qu'à partir du plasmide thermosensible (GY13760: $\Delta amyE$ (*prepUTs-amyE*⁺), (iv) une souche n'exprimant le gène *hbs*, essentiel, qu'à partir du plasmide thermosensible (GY13795 : Δhbs (*prepUTs-hbs*⁺)).

Les résultats sont présentés Figure 51. A 37°C, les bactéries perdent rapidement le plasmide à réplication thermosensible, comme le montre leur sensibilité à la spectinomycine à 37°C. Si le gène étudié exprimé uniquement à partir du plasmide thermosensible joue un rôle important, les cellules ne seront pas viables ou montreront des défauts de croissance à 37°C. Ici nous voyons qu'à 28°C, toutes les souches poussent sans exception en présence ou en absence de spectinomycine (panneaux A et B). Par contre à 37°C, (panneau D), comme le témoin (iv) Δhbs /*prepUTs-hbs*⁺, la souche $\Delta ruvC$ /*prepUTs-ruvC*⁺ est incapable de croître du fait de la perte du plasmide à réplication thermosensible et de l'absence d'expression du gène *ruvC*⁺ à partir du plasmide.

En conclusion, nous avons montré que *ruvC* est un gène essentiel à la viabilité cellulaire contrairement à ce qui est montré chez *E.coli* où le gène *ruvC* est dispensable pour la viabilité des cellules (Mandal *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que la protéine RuvC, du fait de l'absence de RecBC, pourrait jouer un rôle essentiel dans la prise en charge des fourches de réplication bloquées.

Chez *D.radiodurans*, il n'y a pas de voie RecBCD pour dégrader les structures formées lors de l'appariement des brins néosynthétisés lors des réversions de fourches stabilisées par RuvAB. Par contre, j'ai montré que RuvC était une protéine essentielle chez *D.radiodurans* ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un rôle très important dans la résolution des intermédiaires branchés pouvant se produire lors des mécanismes de prise en charge de fourches de réplication bloquée et notamment lors de la réversion de fourche stabilisée par RuvAB.

Il serait intéressant de regarder si comme RuvC, les protéines RuvAB sont essentielles à la viabilité cellulaire ou si leur absence impacte la recombinaison entre les séquences répétées. Il serait également intéressant d'étudier le rôle de RecG étant donné que cette protéine est également impliquée dans la migration de structures branchées de l'ADN dans certains contextes (notamment en absence de RuvABC ((Lloyd, 1991); (Ryder *et al.*, 1994); (Al-Deib *et al.*, 1996),(Vincent *et al.*, 1996)).

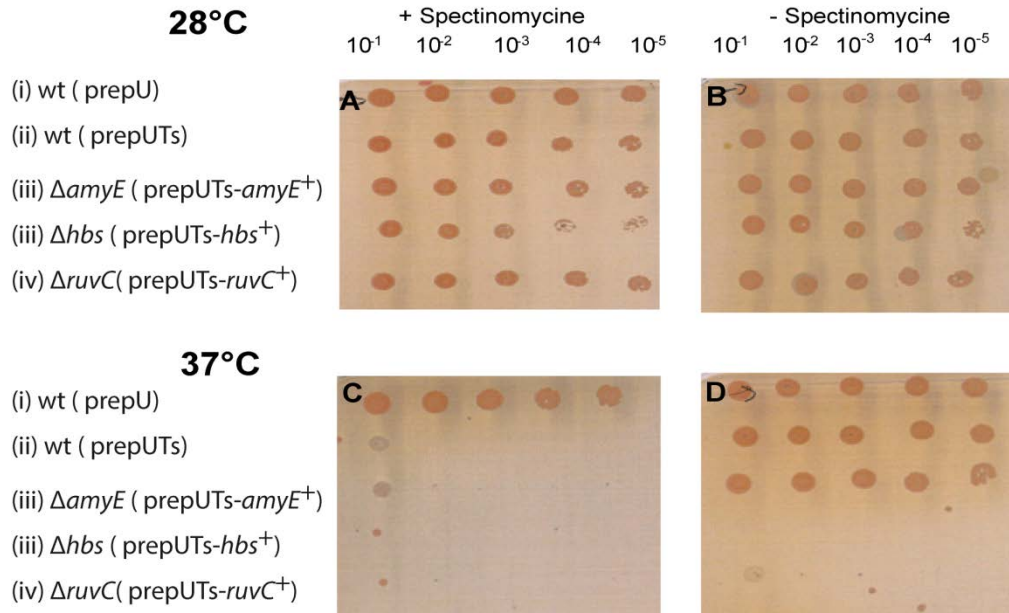


Figure 51 : Viabilité conditionnelle des cellules de *D.radiodurans* exprimant le gène *ruvC* à partir d'un plasmide à réplication thermosensible.

Les cellules sont cultivées en milieu liquide à température permissive de 30°C. Les dilutions des cellules sont déposées sur un milieu solide contenant ou non de la spectinomycine et incubée à 28°C ou 37°C. prepU : plasmide à réplication non thermosensible. prerUTs : plasmide à réplication thermosensible. Deux témoins sont également testés : une souche (iii) n'exprimant le gène *amyE*, non essentiel, que sur le plasmide thermosensible (GY13760: $\Delta amyE$ (*prepUTs-amyE⁺*), (iv) une souche n'exprimant le gène *hbs*, essentiel, que sur le plasmide thermosensible [GY13795 : Δhbs (*prepUTs-hbs⁺*)].

IV. Récapitulatif des résultats obtenus

Les tableaux 4 et 5 (pages suivantes) récapitulent les phénotypes cellulaires observés, les fréquences de recombinaison observées et les mécanismes possibles de recombinaison entre les séquences répétées en fonction des génotypes étudiés dans ce travail.

Génotype des souches	Phénotypes des souches	Fréquence de [Tet ^R] (recombinaison entre séquences répétées)
Conditions physiologiques		
<i>recA</i> ⁺	(souche sauvage)	de l'ordre de 6,5.10 ⁻⁴
<i>ΔrecA</i> et <i>ΔrecO</i> , <i>ΔrecF</i>	plus de 90 % de mortalité, temps de génération de 5 à 6 heures	de l'ordre de 8.10 ⁻⁴ dans les 10 % de bactéries viables
<i>ΔddrB</i>	idem souche sauvage	réduction de l'ordre de 2 à 3 fois si la taille de l'espaceur est supérieure à 3500 pb
<i>ΔddrBΔrecA</i> et <i>ΔddrBΔrecO</i>	plus de 95 % de mortalité et plus particulièrement en phase stationnaire prolongée temps de génération de 5 à 6 heures	réduction de l'ordre de 5 fois par rapport aux simples mutants <i>ΔrecA</i> et <i>ΔrecO</i>
<i>ΔuvrD</i>	temps de génération augmenté synthèse d'ADN ralentie avec probablement perturbation de la réplication	augmentation de 21 fois par rapport à une souche sauvage
<i>ΔuvrDΔrecA</i>	non viable, coléthalité	-
<i>ΔruvC</i>	non viable, gène essentiel	-
Après irradiation		
<i>recA</i> ⁺	viabilité de 100% à 5 kGy	augmentation de 5 à 10 fois par rapport à des cellules non irradiées
<i>ΔddrB</i>	viabilité de 100% à 5 kGy retard de réparation du génome	augmentation de 2 à 3 fois par rapport à des cellules non irradiées
<i>ΔuvrD</i>	réparation du génome et synthèse d'ADN au cours de l'ESDSA retardées	augmentation très faible par rapport à des cellules non irradiées

Tableau 4 : Récapitulatif des phénotypes observés dans ce travail sur la viabilité cellulaire et la fréquence de recombinaison entre séquences répétées chez *D. radiodurans*.

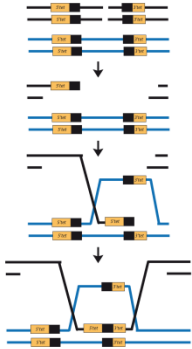
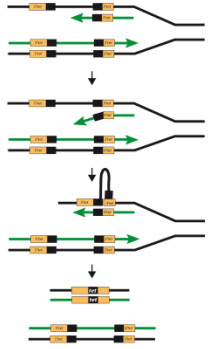
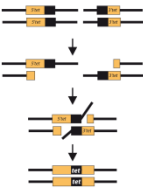
Génotype des souches	Mécanismes de recombinaison entre les séquences répétées		
	RecA-dépendants	RecA-indépendants	
	Délétion par recombinaison homologue entre les séquences répétées 	Glissement de polymérase 	Réparation par SSA des cassures de l'ADN engendrées entre les régions répétées par blocage de fourches de réplication 
	Conditions physiologiques		
<i>recA</i> ⁺	majoritaire	possible jusqu'à une distance de 3500 pb entre les séquences répétées	possible la part devient plus importante quand les séquences répétées sont espacées de plus de 3500 pb
$\Delta recA$ et $\Delta recO, \Delta recF$	abolie	possible jusqu'à une distance de 3500 pb entre les séquences répétées	majoritaire
$\Delta ddrB$	majoritaire	possible jusqu'à une distance de 3500 pb entre les séquences répétées	abolie
$\Delta ddrB \Delta recA$ et $\Delta ddrB \Delta recO$	abolie	possible dans les événements résiduels	abolie
$\Delta uvrD$	majoritaire probablement augmentée	probablement augmenté	probablement augmenté
$\Delta uvrD \Delta recA$	-	-	-
$\Delta ruvC$	-	-	-
	Après irradiation		
<i>recA</i> ⁺	recombinaison induite par l'irradiation mécanisme majoritaire (recombinaison homologue et ESDSA)	induction peu probable	SSA induit mécanisme précoce de réparation des cassures de l'ADN
$\Delta ddrB$	recombinaison induite par l'irradiation mécanisme majoritaire (recombinaison homologue et ESDSA)	induction peu probable	SSA aboli
$\Delta uvrD$	taux de recombinaison déjà élevée en conditions non irradiées	induction peu probable	non testé dans mutant $\Delta uvrD \Delta ddrB$

Tableau 5 : Mécanismes possibles de recombinaison entre les séquences répétées chez *D. radiodurans* en fonction des génotypes étudiés lors de ce travail.

(Schéma des mécanismes possibles de recombinaison entre les séquences répétées: lignes bleues : molécule homologue à celle représentée en lignes noires; lignes vertes : ADN néosynthétisé; rectangles oranges : régions 5' et 3' *tetA*; rectangles noirs : régions répétées de 438 pb. La distance entre les régions répétées n'est pas à l'échelle et peut représenter les 4 tailles testées.)

Chapitre 2

Rôle de la protéine DprA dans la transformation par de l'ADN génomique et de l'ADN plasmidique chez *D. radiodurans*

Travail réalisé en collaboration

avec Johnny Lisboa et Sophie Quevillon-Cheruel,

I2BC , équipe d'Herman van Tilbeurgh

Avant propos

La recombinaison homologue est un mécanisme très efficace de réparation des cassures double brin de l'ADN et elle contribue grandement à la préservation de l'intégrité des génomes. Elle joue également un rôle important dans l'évolution des génomes puisqu'elle est impliquée dans les transferts horizontaux de gènes et, plus particulièrement, dans la transformation bactérienne. Des bactéries dites compétentes, sont capables d'internaliser dans leur cytosol de l'ADN présent dans le milieu extracellulaire. Si cet ADN comporte une séquence homologue à une séquence présente dans le génome de la cellule hôte, celui-ci sera alors intégré par recombinaison homologue dans le génome bactérien. La transformation bactérienne nécessite plusieurs étapes clés. L'ADN extracellulaire doit d'abord être internalisé dans la cellule et donc passer la barrière de la membrane et de la paroi bactériennes. Une fois dans le milieu intracellulaire, cet ADN doit être protégé de la dégradation. Pour se maintenir dans la cellule, il doit ensuite être soit intégré dans le génome soit s'installer de façon autonome sous forme de plasmide répliquatif. *D. radiodurans* est une bactérie naturellement transformable, ce qui en fait un organisme modèle facilement manipulable génétiquement, mais peu de travaux ont concerné jusqu'à présent les mécanismes et les protéines impliqués dans la transformation chez *D. radiodurans*. Après un tour d'horizon des connaissances des différentes étapes de la transformation chez d'autres organismes naturellement transformables, ce chapitre sera centré sur le rôle de la protéine DprA dans la transformation chez *D. radiodurans*.

Phylum	Espèces	Phylum	Espèces
Gram positives		Gram négatives	
Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		<i>Methylobacterium organophilum</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>	Proteobacteria Beta	<i>Achromobacter spp.</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>		<i>Eikenella corrodens</i>
	<i>Leuconostoc carnosum</i>		<i>Kingella denitrificans</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Kingella kingae</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>		<i>Neisseria meningitidis</i>
	<i>Streptococcus crista</i>		<i>Ralstonia solanacearum</i>
	<i>Streptococcus infantis</i>		<i>Thiobacillus thioparus</i>
	<i>Streptococcus gordonii</i>	Proteobacteria Gamma	<i>Acinetobacter baylyi</i>
	<i>Streptococcus sanguinis</i>		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i>		<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
	<i>Streptococcus intermedius</i>		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
	<i>Streptococcus constellatus</i>		<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>		<i>Azotobacter vinelandii</i>
	<i>Streptococcus bovis</i>		<i>Cardiobacterium hominis</i>
	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Gallibacterium anatis</i>
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>
Actinobacteria	<i>Mycobacterium segmatis</i>		<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
	<i>Streptomyces spp.</i>		<i>Haemiphilus parasuis</i>
			<i>Legionella pneumophila</i>
			<i>Moraxella spp.</i>
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			<i>Pseudomonas stutzeri</i>
			<i>Pseudomonas spp.</i>
			<i>Vibrio cholerae</i>
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
			<i>Vibrio spp.</i>
		Proteobacteria Epsilon	<i>Campylobacter coli</i>
			<i>Campylobacter jejuni</i>
			<i>Helicobacter pylori</i>

Phylum	Espèces
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus radiodurans</i>
	<i>Thermus aquaticus</i>
	<i>Thermus caldophilus</i>
	<i>Thermus flavus</i>
	<i>Thermus thermophilus</i>

Tableau 6 : Exemples de bactéries naturellement compétentes parmi les bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que dans le phylum Deinococcus-Thermus (d'après (Johnsborg *et al.*, 2007), actualisé en 2013 par (Lisboa, 2013))

I. INTRODUCTION

1. La transformation naturelle à travers les espèces bactériennes

La transformation naturelle est un mode de transfert horizontal de gènes qui contribue au maintien et à l'évolution des génomes bactériens. L'échange d'ADN lors de la transformation a été mis en évidence chez *Streptococcus pneumoniae* en 1944 par Avery et al lors de l'étude de l'acquisition de la capsule par des souches non capsulées déjà observée par Griffith et al., en 1928 (Griffith, 1928). Depuis, la transformation naturelle a été décrite dans plus de 90 espèces de bactéries (Johnsborg *et al.*, 2007) dans différents phyla et aussi bien chez les bactéries Gram-positives que Gram-négatives. Certaines bactéries sont devenues des modèles pour l'étude de la transformation : *Bacillus subtilis* et *S. pneumoniae* pour les bactéries Gram-positives, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, pour les bactéries Gram-négatives ainsi que *Thermus thermophilus* appartenant au Phylum *Deinococcus-Thermus*.

Parmi toutes ces bactéries, certaines sont capables d'internaliser de l'ADN exogène en permanence comme *T. thermophilus* et *H. pylori* tandis que chez d'autres, comme *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, une différenciation physiologique dans un état dit de compétence est nécessaire. La période pendant laquelle la compétence est observée et la durée de cette phase est différente selon les organismes. La phase de compétence de *S. pneumoniae* est observée dans quasiment toutes les cellules en phase exponentielle de culture et recouvre une période d'une trentaine de minutes (Tomasz, 1966) tandis que chez *B. subtilis*, la phase de compétence n'est observée que dans 10 % des cellules lors de l'entrée en phase stationnaire (Smits *et al.*, 2005, Maamar & Dubnau, 2005). Durant cette période, des systèmes de régulation sont mis en place afin de permettre l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans les machineries nécessaires à la transformation, à l'internalisation de l'ADN, à la prise en charge de l'ADN dans le milieu intracellulaire et la recombinaison homologue.

La transformation naturelle chez *D. radiodurans* a été mise en évidence en 1968 dans des études de Moseley et Setlow (Moseley & Setlow, 1968). D'après Tirgary & Moseley (Tirgari & Moseley, 1980), *D. radiodurans* est transformable tout au long de la phase exponentielle de croissance. Plus les cellules sont en phase stationnaire prolongée, plus l'efficacité de transformation diminue. La fréquence de transformation réaugmente lorsque ces cellules reprennent leur croissance après dilution dans un milieu frais (Figure 52).

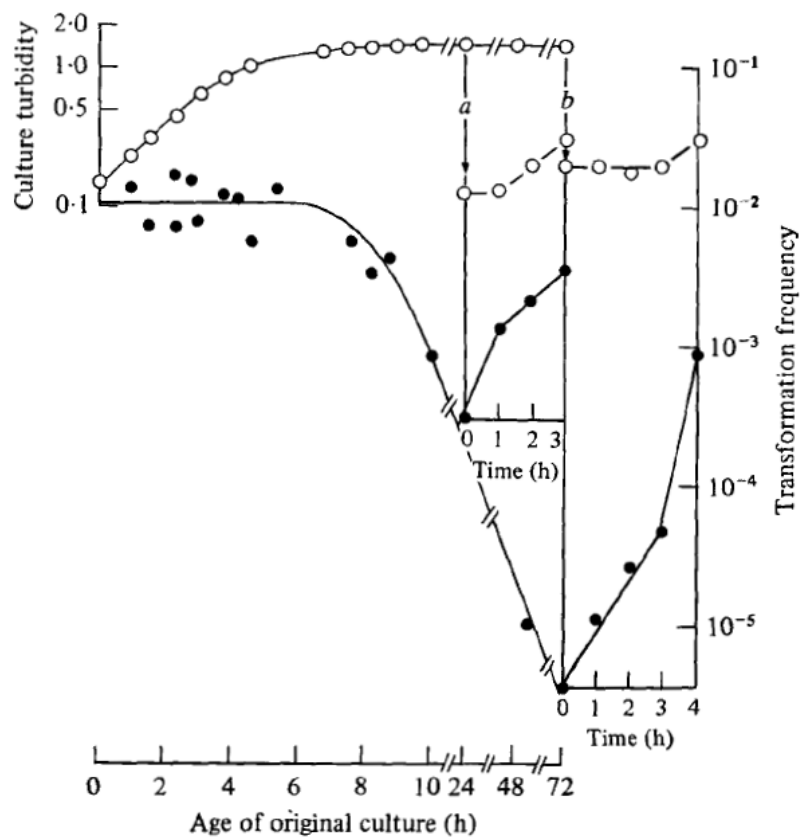


Figure 52 : Suivi de la fréquence de transformation par de l'ADN génomique au cours du temps chez *D. radiodurans* (Tirgari & Moseley, 1980).

La transformation de *D. radiodurans* par de l'ADN génomique conférant la résistance à la rifampycine est suivie au cours du temps (ronds noirs) ainsi que la turbidimétrie (ronds blancs). Alors que la fréquence de transformation diminue lors de la phase stationnaire, la dilution des cellules à une DO proche de 0,1 aux temps 24h (a) et 72h (b), montre que les cellules redeviennent compétentes lorsqu'elles reprennent une croissance exponentielle.

2. La transformation, étape par étape

A. Internalisation de l'ADN extracellulaire

Etant donné que l'on retrouve des bactéries naturellement transformables chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, la première étape cruciale, qui consiste en l'internalisation de l'ADN extracellulaire dans le cytosol de la bactérie, représente un challenge différent selon le nombre de membranes à franchir (Figure 53).

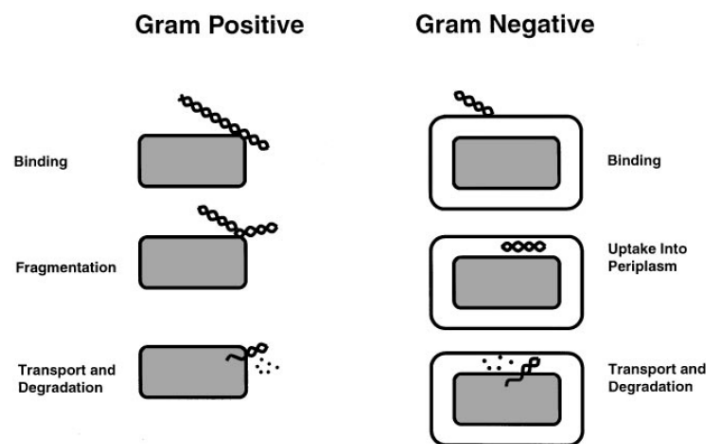


Figure 53 : Voies de transformation chez les bactéries Gram-positives et chez les bactéries Gram-négatives. (Dubnau, 1999)

Cependant, ces groupes de bactéries utilisent toutes deux pour l'internalisation de l'ADN, des pseudopili, machineries dérivées des systèmes de formation de pili de type IV, de sécrétion de type II ou de sécrétion de type IV.

a) Les pseudopili dérivés des systèmes de formation des pili de type IV (T4P) et de sécrétion de type II (T2SS) et IV (T4SS).

Les pili de type IV (Figure 54) sont de longues fibres exposées à la surface de la cellule impliquées dans plusieurs processus nécessitant une interaction avec le milieu extracellulaire : la mobilité, la formation des biofilms, l'adhésion à l'organisme hôte et la virulence, l'internalisation d'ADN ou la sécrétion de protéines. Ces structures ont principalement été décrites chez les bactéries Gram-négatives, groupe dans lequel, la présence de pili de type IV est très largement répandue (Pellicic, 2008) et elles ont été particulièrement étudiées chez les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *N. gonorrhoeae* (Melville & Craig, 2013, Li *et al.*, 2012). Récemment, elles ont également été mises en évidence chez des bactéries Gram-positives (Imam *et al.*, 2011), toutefois, leur distribution dans ce groupe semble très éparse (Melville & Craig, 2013).

Les systèmes de sécrétion de type IV (T4SS), sont impliqués dans les mécanismes de transport d'ADN lors de la conjugaison et dans la virulence permettant l'adhésion à la cellule hôte et la sécrétion de toxines. Ils sont retrouvés chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives (pour revue : (Bhatty *et al.*, 2013, Christie *et al.*, 2014)).

Les pili de type IV et les systèmes de sécrétion de type II (Figure 54) (pour revue (Melville & Craig, 2013, Chen & Dubnau, 2004) permettent en général de transporter des molécules de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Les pseudopili dérivés de ces systèmes sont utilisés chez la plupart des bactéries naturellement compétentes lors de la transformation dans le sens inverse pour « capturer » et internaliser de l'ADN extracellulaire. On retrouve au niveau de la membrane interne des ATPases et des translocases, des protéines formant un conduit à travers le périplasm ainsi que des protéines de type pilines. Chez *H. pylori*, la machinerie utilisée est semblable au système de sécrétion de type IV (pour revue : (Fernandez-Gonzalez & Backert, 2014, Bhatty *et al.*, 2013, Christie *et al.*, 2014)).

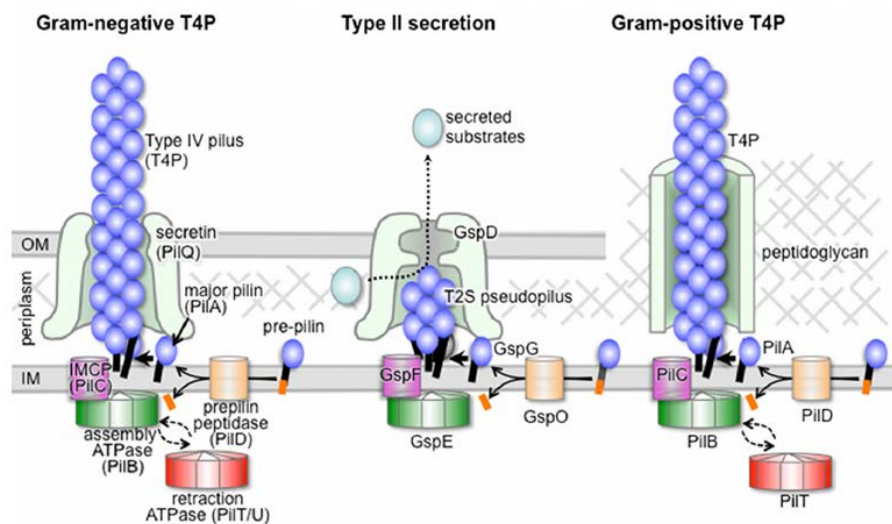


Figure 54 : Schéma des principaux composants des systèmes de pili de type IV, d'un système de sécrétion de type II chez les bactéries Gram négatives et du système de pili de type IV chez les bactéries Gram positives et leur localisation dans l'enveloppe bactérienne (Melville & Craig, 2013)

Le complexe IMCP (Inner Membrane Core Protein) dans la membrane interne, l'ATPase impliquée dans l'assemblage du pilus et les protéines accessoires ancrées à la membrane interne (non montrées) et probablement l'ATPase impliquée dans la rétractation du pilus forment une plateforme d'assemblage dans la membrane interne. Le cylindre entourant le pilus dans le schéma du T4P chez les bactéries Gram-positives est une protéine hypothétique à travers laquelle le pilus s'étendrait et se rétracterait à travers le peptidoglycane. IM : Inner Membrane (membrane interne), OM : Outer Membrane (membrane externe). T4P : système de pili de type IV.

b) Fixation, internalisation et translocation de l'ADN

L'ADNdb extracellulaire, se fixe sur les pseudopili à la surface des bactéries. Cette fixation se fait sans spécificité de séquence, excepté chez certaines bactéries Gram-négatives comme chez les *Neisseriaceae* et *H. influenzae* où une séquence appelée DUS pour DNA Uptake Sequence est reconnue spécifiquement par une protéine associée au système de sécrétion du pilus. Ces séquences longues d'environ 10 pb sont enrichies dans les génomes de ces deux espèces entraînant un biais favorisant l'échange d'ADN avec des bactéries de leur espèce ou d'une espèce proche (Duffin & Seifert, 2010, Mell *et al.*, 2012, Frye *et al.*, 2013). Ceci favorise ou exclut certains échanges horizontaux et apporte une nouvelle approche pour retracer et comprendre la co-évolution ou la divergence entre certains groupes de bactéries (Mell *et al.*, 2014).

Chez les bactéries Gram positives, l'ADN serait fragmenté avant d'être acheminé à la membrane. En effet, il a été montré chez *B. subtilis* que l'endonucléase de surface NucA qui introduit des clivages double brin, augmenterait le taux d'absorption de l'ADN. NucA participe également à la formation d'extrémités simples brin nécessaires à la translocation de l'ADN (Provvedi *et al.*, 2001). Chez les bactéries Gram-négatives, cette fragmentation s'effectuerait dans le périplasme, mais aucune protéine impliquée dans cette étape, n'a été trouvée à ce jour.

La première étape de l'internalisation de l'ADN consiste au transfert de l'ADN jusqu'à la membrane cytoplasmique à travers le peptidoglycane pour les bactéries Gram-positives comme *B. subtilis* ou la membrane externe et le périplasme pour les bactéries Gram-négatives comme *N. gonorrhoeae* ou *H. pylori* grâce à des pseudopili (Figure 55). Les particularités de chaque système utilisés chez ces espèces pour internaliser l'ADN sont retrouvées au niveau de la première étape où chaque type de bactérie utilise un système de pseudopili différent : des systèmes de pilus de type IV pour *B. subtilis* et *N. gonorrhoeae* et un système de sécrétion de type IV pour *H. pylori*. La deuxième étape de translocation de l'ADN à travers la membrane cytoplasmique est très conservée. Celle-ci implique le tunnel ComEC (ComA chez *N. gonorrhoeae*). ComEA ou sa version soluble chez *N. gonorrhoeae* se fixe à l'ADN et l'achemine jusqu'au tunnel ComEC. En hydrolysant l'ATP, l'hélicase ComFA ou son homologue PriA entrainerait l'internalisation de l'ADNsb qui est ensuite immédiatement protégé par des protéines. Chez *N. gonorrhoeae*, une sélection de l'ADN entrant est réalisée via la reconnaissance d'une séquence spécifique DUS par un récepteur putatif DUS-R.

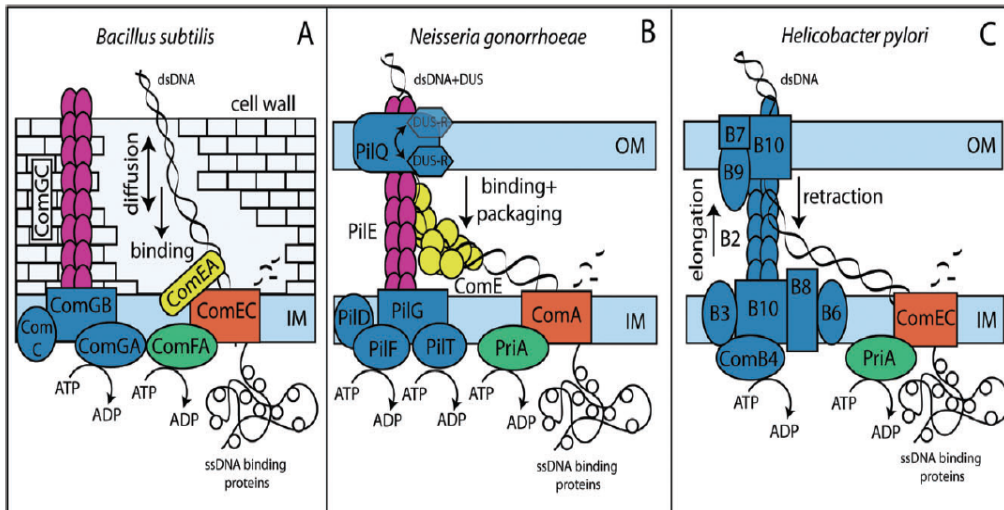


Figure 55 : Modèle des machineries d'intégration de l'ADN chez les bactéries Gram positives (*B. subtilis*) et Gram négatives (*N. gonorrhoeae*, *H. pylori*) (Kruger & Stingl, 2011)

Machineries d'intégration de l'ADN chez *B. subtilis* (A), *N. gonorrhoeae* (B) et *H. pylori* (C). Les particularités de chaque système sont indiquées en bleu foncé. Les composants homologues sont identifiés par des couleurs identiques. Membrane cytoplasmique (IM), membrane externe (OM).

Bien que démontré chez très peu d'espèces, tous les modèles d'entrée de l'ADN reposent sur la translocation de l'ADN sous forme simple brin à travers ComEC et la dégradation concomitante du deuxième brin (Figure 55).

Ce n'est que chez *S. pneumoniae*, qu'une protéine responsable de la formation de cet ADN simple brin a été décrite. Cette protéine EndA est une endonucléase membranaire exprimée en dehors de la compétence, son recrutement au niveau des machineries de transformation nécessite ComEA. *In vitro*, la dégradation de l'ADN par EndA est plus importante pour l'ADNsb que pour l'ADNdb et *in vivo* la dégradation de l'ADN par EndA nécessite la présence de ComEA (Berge *et al.*, 2003) et (Berge *et al.*, 2002)). Il a donc été proposé que ComEA soit nécessaire pour présenter l'ADNdb à EndA et pour moduler son activité endonucléase. Chez *S. pneumoniae* et *H. influenzae*, il a été montré que l'ADNsb rentre dans le cytoplasme avec une polarité 3'-5', libérant ainsi une extrémité 3' simple brin, substrat de prédilection pour la recombinaison. Cette polarité n'a pas pu être mise en évidence chez *B. subtilis*.

Chez *B. subtilis*, côté cytoplasmique, une hélicase ATP dépendante, ComFA, fait également partie de la machinerie de translocation de l'ADN, probablement en jouant un rôle de moteur fournissant la force d'internalisation de l'ADNsb à travers ComEC. Cette protéine jouerait également un rôle dans la coordination entre la machinerie d'internalisation de l'ADN et les protéines de recombinaison (Kramer *et al.*, 2007). Le plus proche homologue de ComFA chez *N. gonorrhoeae* et *H. pylori* est PriA, impliquée dans la reprise des fourches de réplication bloquées et dans la réparation de l'ADN. Son

implication dans la transformation a été prouvée chez *N. gonorrhoeae* mais un rôle homologue à celui de ComFA n'a pas été établi pour le moment.

On retrouve des homologues des protéines Com ainsi que des piliers de type IV chez *D. deserti* et *D. radiodurans* (Tableau 5), on peut donc supposer qu'un système dérivé d'un pilus de type IV puisse être impliqué dans l'internalisation de l'ADN chez ces deux espèces. Il est intéressant de noter qu'un des gènes les plus induits après irradiation (15 fois, (Liu *et al.*, 2003)) est un gène codant une protéine homologue à ComEA. On peut donc se demander si la compétence est un processus faisant partie de la réponse aux radiations.

Protéines impliquées dans l'internalisation de l'ADN	Annotations des gènes codant pour des protéines homologues chez <i>D.deserti</i> VCD115			Annotations des gènes codant pour des protéines homologues chez <i>D.radiodurans</i> R1		
		Référence	Commentaires		Référence	Commentaires
ComEC/Rec2	Deide_03860	De Groot et al., 2009		DR_1854	Makarova et al., 2001	
ComEA	Deide_03861	De Groot et al., 2009		DR_1855	Makarova et al., 2001	
				DR_0207	Liu et al., 2003	parmi les 10 gènes les plus induits après irradiation (induction de 15 fois)
ComF	Deide_05371	De Groot et al., 2009		DR_1389		alignements avec l'homologue de <i>D.deserti</i>
ComEC	Deide_22410	De Groot et al., 2009		DR_0361	Liu et al., 2003	alignements avec l'homologue de <i>D.deserti</i> induit après irradiation
Pilaine de type IV	Deide_06550	De Groot et al., 2009		DR_1232/1233/1234/1235	Makarova et al., 2001	
	Deide_21840	Dedieu et al., 2013	induit de deux fois environ après irradiation	DR_0442		alignements avec l'homologue de <i>D.deserti</i>

Tableau 7 : Gènes codant pour des homologues des systèmes d'internalisation de l'ADN chez *D.deserti* et *D.radiodurans*.

B. Devenir de l'ADN internalisé

a) Protection de l'ADN transporté dans le milieu intracellulaire

Une fois transporté à travers la membrane interne, l'ADNsb est très vulnérable aux nucléases présentes dans le cytoplasme, il est directement pris en charge par des protéines qui vont le protéger de la dégradation. Cette association d'ADN et de protéines forment le complexe d'éclipse (Figure 56). Ce nom lui a été attribué suite aux travaux de Morrison dans les années 70 chez *S. pneumoniae*, lors desquels il a été montré que de l'ADN extrait de bactéries venant juste d'être transformées ne permettait pas de transformer à nouveau d'autres bactéries de manière efficace (Morrison, 1977, Morrison, 1978, Morrison & Mannarelli, 1979). Ces travaux ont également montré que cet ADN ne se comportait pas comme de l'ADN nu puisqu'il était moins dégradé par les nucléases et qu'il était associé à des protéines. Ce n'est que 30 ans plus tard que Morrison et ses collaborateurs ont pu déterminer la nature de ces protéines (Morrison *et al.*, 2007). Il s'agit de protéines de la famille SSB (Single Strand DNA Binding protein), avec très majoritairement SsbB, une protéine induite lors de la compétence et plus faiblement SsbA plus connue pour protéger les régions d'ADN simple brin générées lors de la réplication. Lors de la compétence, l'induction de SsbB engendrerait une concentration cellulaire de SsbB 20 fois supérieure à celle de SsbA et le nombre total de protéines SsbB pourrait recouvrir jusqu'à 1,5 Mpb d'ADNsb, cet ADN couvert de SsbB constituant un véritable réservoir pour les intégrations génomiques (Attaiech *et al.*, 2011). Cependant, de manière inattendue compte tenu de son rôle dans la protection de l'ADNsb contre la dégradation, l'absence de SsbB n'entraîne qu'une diminution modeste du taux de transformation de 3 à 8 fois, suggérant que d'autres protéines participent à cette protection (Berge *et al.*, 2003, Morrison *et al.*, 2007, Mortier-Barriere *et al.*, 2007). Il a été montré qu'une autre protéine, DprA, joue un rôle majeur dans la protection de l'ADNsb mais également dans le recrutement de la recombinaison RecA sur l'ADNsb (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). La formation d'un filament nucléoprotéique RecA-ADNsb constitue la première étape de la recombinaison (étape présynaptique) qui va permettre l'intégration de l'ADN internalisé dans une région homologue du génome de la cellule hôte. RecA participe également à la protection de l'ADNsb contre la dégradation. L'ADN non protégé est dégradé en nucléotides pouvant être recyclés et réincorporés dans le génome de l'organisme receveur lors de la réplication (Mejean & Claverys, 1984).

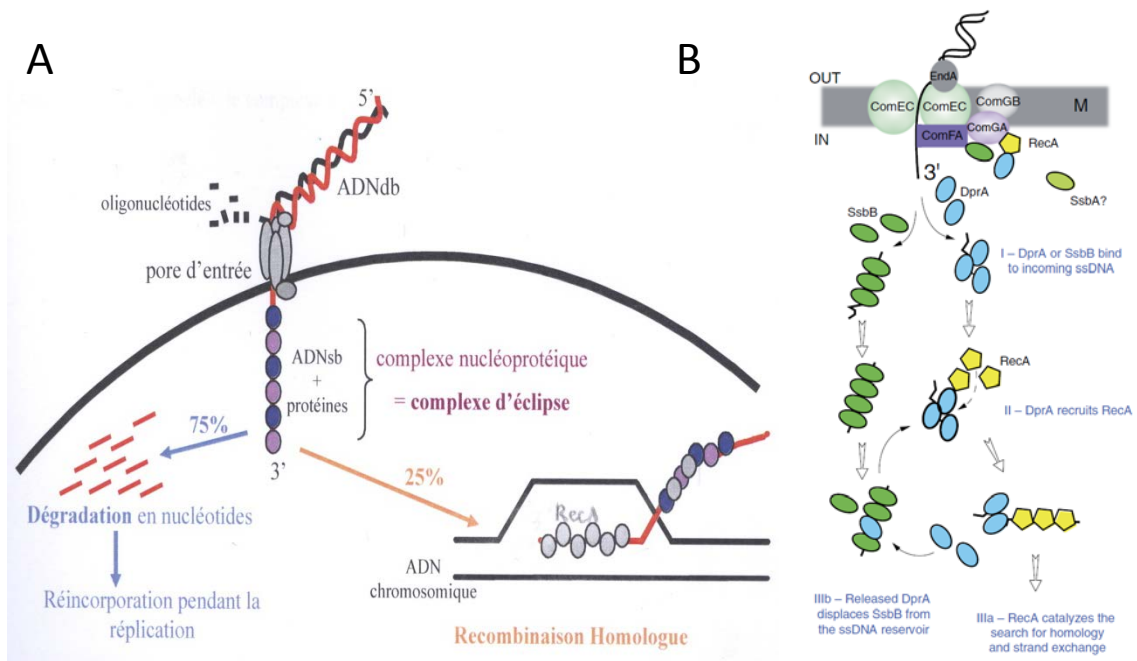


Figure 56 : Complexe d'éclipse lors de la transformation chez *S.pneumoniae* (d'après (Attaiech, 2009) et (Mortier-Barriere et al., 2007)).

A. Devenir de l'ADN internalisé chez *S.pneumoniae*. L'ADNsb internalisé est immédiatement protégé par des protéines afin de pouvoir être intégré dans le génome par recombinaison homologue. L'ADNsb non protégé est dégradé en nucléotides pouvant être réutilisés par la cellule hôte.

B. Rôles de DprA, SsbB et RecA dans la prise en charge de l'ADNsb internalisé. L'ADNsb est pris en charge par DprA qui charge ensuite RecA pour permettre l'intégration de l'ADN dans le chromosome. La fixation de SsbB, sur l'ADNsb constitue un réservoir d'ADNsb pouvant être pris en charge par la suite par DprA et RecA.

b) Etablissement de l'ADN internalisé dans la cellule hôte Fixation, internalisation et translocation de l'ADN

Le devenir de l'ADN internalisé dépend de sa nature, selon qu'il provienne d'ADN chromosomique ou d'ADN plasmidique ayant la capacité de se répliquer de façon autonome dans la cellule hôte et qu'il ait ou non de l'homologie avec l'ADN de la cellule hôte. Si l'ADN internalisé présente de l'homologie avec une région du génome de la cellule hôte, il pourra y être intégré par recombinaison. Si l'ADN internalisé est un plasmide capable de se répliquer dans la cellule hôte, la reformation d'une molécule d'ADN double brin circulaire est nécessaire à son établissement. Chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, l'établissement des plasmides nécessite l'appariement par SSA des fragments de plasmides simple brin complémentaires puis une synthèse d'ADN afin de combler les brèches d'ADN et de reconstituer une molécule d'ADN double brin (Figure 57) (Saunders & Guild, 1981, Kidane *et al.*, 2009). Chez *B. subtilis*, c'est la protéine RecO qui intervient dans ce processus (Kidane *et al.*, 2009). L'absence de RecO affecte peu la rtransformation plasmidique chez *D. radiodurans* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). En revanche, DdrB, une protéine SSB like, ayant une activité de type SSA *in vitro* (Xu *et al.*, 2010), est impliquée dans ce processus (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) (voir également le paragraphe II.1.B.a.).

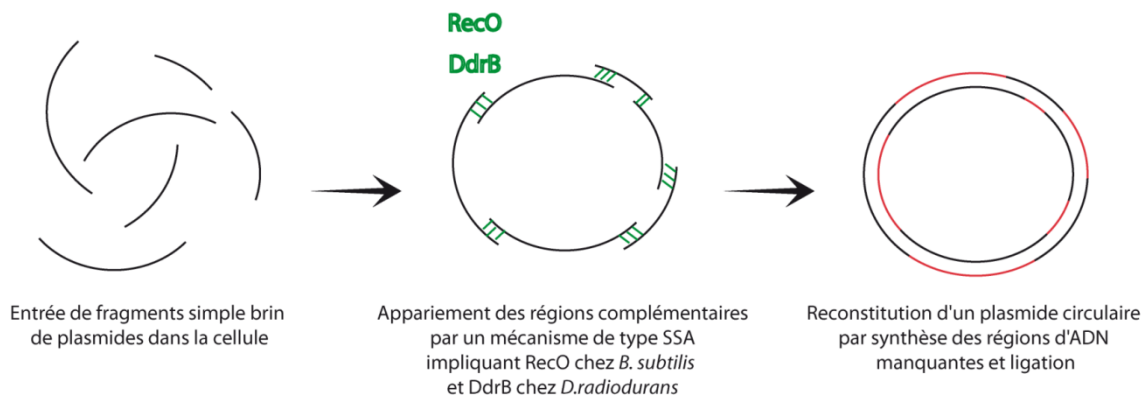


Figure 57 : Etapes d'établissement de l'ADN plasmidique dans la cellule lors de la transformation impliquant une étape de SSA.

3. Rôle de la protéine DprA dans la transformation

Il a été montré que la protéine DprA, induite lors de la transformation, joue un rôle crucial non seulement dans la protection de l'ADN internalisé contre la dégradation mais également lors de l'établissement de l'ADN internalisé dans la cellule.

A. Découverte, distribution phylogénique, architecture structurale

Ce sont des études chez *H. influenzae* qui ont mis en évidence pour la première fois la protéine DprA. L'étude d'un mutant, issu d'une banque obtenue par transposition (Tomb *et al.*, 1989) a permis de décrire pour la première fois le gène *dprA* (Karudapuram *et al.*, 1995). La délétion de ce gène supprime quasiment la transformation mais entraîne des défauts uniquement au niveau de la prise en charge (processing) de l'ADN dans la cellule et non au niveau de l'internalisation de l'ADN, phénotype qui lui vaut son nom de *dpr* pour **DNA processing**.

Par la suite, d'autres gènes *dprA* ont été identifiés chez d'autres bactéries naturellement transformables comme *H. pylori* (Ando *et al.*, 1999, Smeets *et al.*, 2000), *T. thermophilus* (Friedrich *et al.*, 2002), *B. subtilis* (Ogura *et al.*, 2002), *S. pneumoniae* (homologue *smf*) (Berge *et al.*, 2003), et *Campylobacter jejuni* (Takata *et al.*, 2005). L'étude de la répartition phylogénétique du gène *dprA* (Figure 58) montre que ce gène est présent dans 84% des 317 génomes bactériens entièrement séquencés en 2007, y compris dans ceux de bactéries dites non naturellement transformables comme *E. coli* (Figure 56) (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). L'expression de ^{Ec}*dprA* dans un mutant *dprA* de *H. influenzae* restaure partiellement la transformation (Smeets *et al.*, 2006). Chez *Lactococcus lactis*, la séquence complète du génome en 2001 a permis de montrer la présence de *dprA*, et de gènes *com* (C,EA,EC,FA,FC,GA,GD) constituant du pore d'entrée ainsi que de *comX* (régulateur de la compétence chez *S. pneumoniae*, voir paragraphe 3B de ce chapitre) dont la surexpression entraîne une augmentation de transcrits des gènes *comG,E,F,C* et *dprA*. Cette bactérie jusqu'alors décrite comme non naturellement transformable pourrait bien avoir été mal répertoriée mais des études permettant de déterminer les conditions de compétence sont à mener (Wydau *et al.*, 2006). En dehors des bactéries, le gène *dprA* a également été trouvé chez *Pyrococcus furiosus*, archée marine hyperthermophile, connue pour être naturellement transformable, mais les mécanismes et les gènes associés à cette compétence naturelle restent à identifier (Lipscomb *et al.*, 2011).

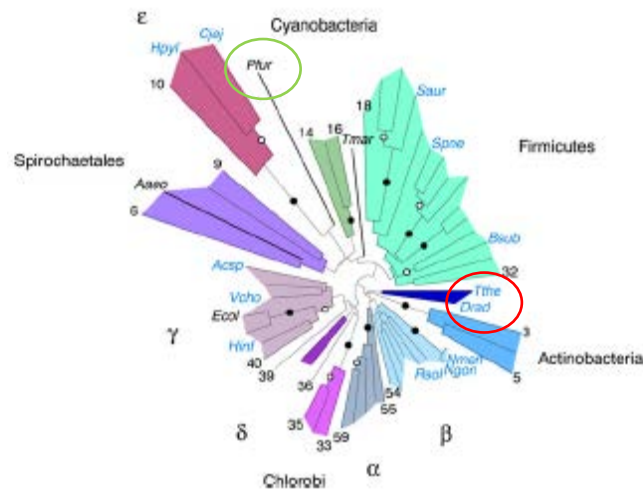


Figure 58 : Arbre phylogénétique représentant la répartition du gène *dprA* dans le monde bactérien (d'après (Mortier-Barriere et al., 2007))

Le nom des espèces bactériennes naturellement transformables sont indiqués en bleu. Le phylum *Deinococcus-Thermus* est entouré en rouge. L'archea *P. furiosus* (*Pfur*) est entourée en vert dans l'arbre phylogénétique.

Parmi les protéines DprA retrouvées dans le règne bactérien, on distingue 3 architectures différentes basées sur 3 domaines (Figure 59) : un domaine central, de type Rossmann Fold, très conservé entre les différentes protéines, avec 30 à 40% d'identités en acides aminés (Figure 560), un domaine N-terminal de type Sam (Stérile alpha motif), décrit comme étant impliqué dans des interactions entre protéines ou entre protéines et acides nucléiques chez *S. pneumoniae* (Qiao & Bowie, 2005) et un domaine C-terminal. Les domaines N-terminal et C-terminal sont beaucoup moins conservés. L'organisation autour du domaine central est très variable puisque les deux ou seulement un des extra-domaines peuvent être présents, même si dans la plupart des cas, on retrouve une architecture à 3 domaines.

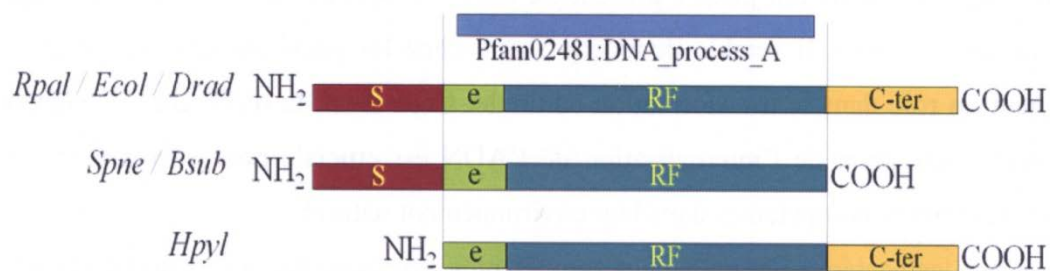


Figure 59 : Composition modulaire de la famille de DprA (Lisboa, 2013).

Le domaine Pfam02481 comprend le Rossmann Fold (RF) ainsi qu'une extension (e). Certaines DprA présentent soit un extra-domaine en N-terminal appelé SAM (S) pour Stérile Alpha Motif, soit un extra-domaine en C-terminal (C-ter). Dans la plupart des cas, les deux extra-domaines sont présents. *Rpal* : *Rodopseudomonas palustris*, *Ecol* : *Escherichia coli*, *Drad* : *Deinococcus radiodurans*, *Spne* : *Streptococcus pneumoniae*, *Bsub* : *Bacillus subtilis* et *HpyI* : *Helicobacter Pylori*.

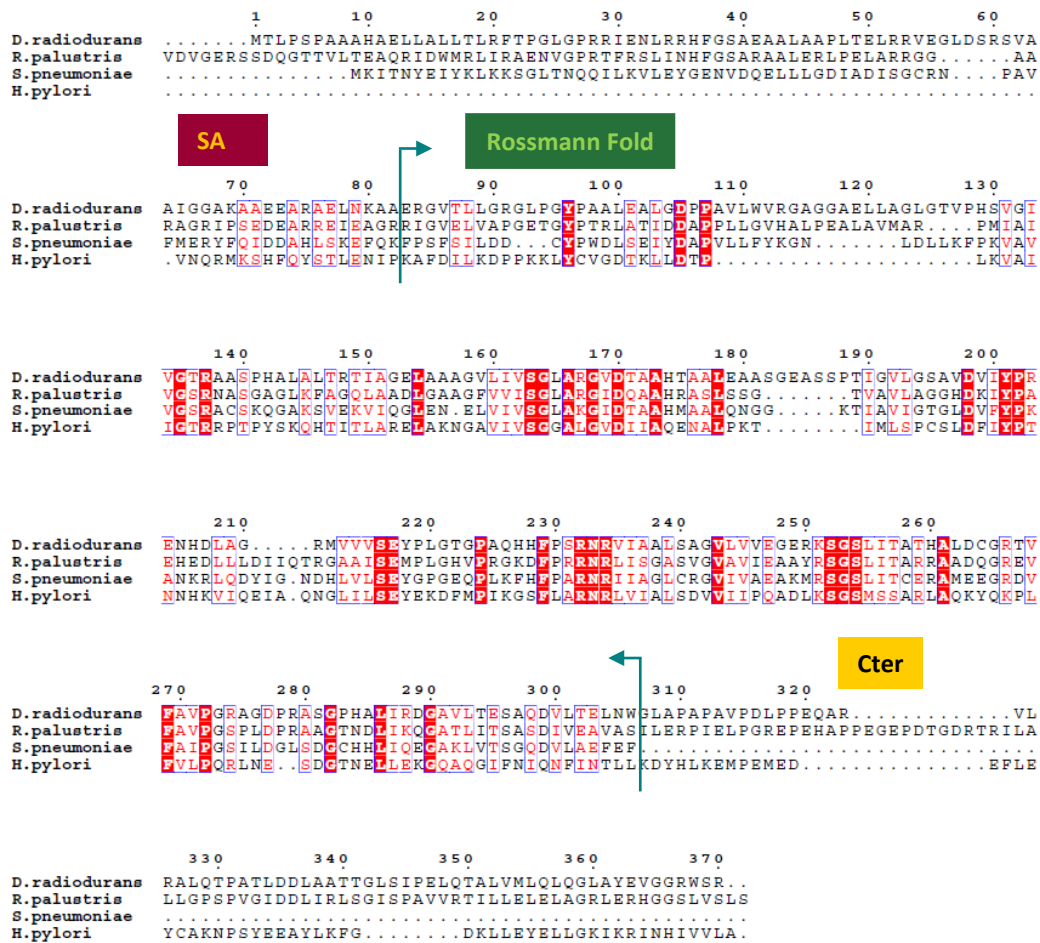


Figure 60 : Conservation des domaines Rossmann Fold et variabilité des extra-domaines des DprA.
Alignement des séquences protéiques et domaines des DprA de *D. radiodurans*, *R. palustris*, *S. pneumoniae* et *H. pylori*. Le domaine le plus conservé entre les différentes DprA est le domaine Rossmann Fold. Les extra-domaines lorsqu'ils sont présents ont des taux de conservation beaucoup plus faibles et ont des tailles variables.

La résolution et l'étude de la structure de DprA de *S. pneumoniae* a permis de mettre en évidence que l'interaction entre des monomères de DprA s'effectuait au niveau de l'extrémité C-terminale du domaine Rossmann Fold et les acides aminés intervenant dans la dimérisation ont pu être identifiés (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012). D'autres acides aminés impliqués dans l'interaction de DprA avec l'ADN et entre DprA et la protéine RecA ont été également identifiés (Figure 61 (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012), (Lisboa *et al.*, 2014)).

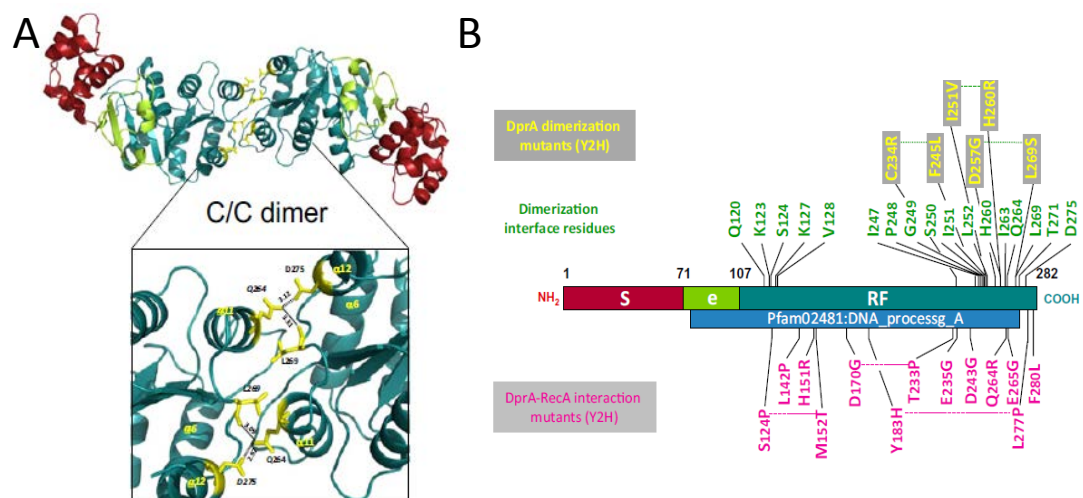


Figure 61 : Structure d'un dimère de DprA de *S.pneumoniae* et résidus impliqués dans diverses interactions (d'après (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012))

Représentation en ruban de la structure d'un dimère de DprA (A). Les couleurs correspondent aux domaines schématisés sur la représentation linéaire de DprA (B). En jaune les résidus impliqués dans l'interaction entre monomères de DprA. Les mutations rendant l'interaction entre deux monomères de DprA mais conservant la capacité d'interagir avec RecA sont indiquées en jaune dans des encadrés. Les mutations affectant l'interaction DprA/RecA mais pas la dimérisation de DprA sont indiquées en rose. En vert les acides aminés impliqués dans la dimérisation de DprA.

B. Les rôles de DprA lors de la transformation

a) Fixation sur l'ADNsb entrant et protection contre la dégradation.

Chez *S. pneumoniae*, en absence de DprA ou de RecA, après transformation avec de l'ADN génomique radiomarqué, aucun marquage n'indique une intégration par recombinaison dans le chromosome (Berge *et al.*, 2003). On observe en revanche, un marquage aléatoire du chromosome reflétant l'incorporation lors de la réplication de nucléotides issus de la dégradation de l'ADN donneur (Berge *et al.*, 2003). Des tests *in vitro* ont également démontré que DprA protège l'ADN de l'action de diverses endo- et exo-nucléases (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). Ceci montre qu'en absence de DprA ou de RecA, l'ADN est bien internalisé mais est dégradé. L'affinité de ^{Sp}DprA et ^{Bs}Smf pour l'ADNsb a été démontrée *in vitro* par des expériences de retard sur gel et sa fixation sur l'ADNsb semble se faire de manière coopérative (Mortier-Barriere *et al.*, 2007).

b) Levée de la barrière SSB et chargement de la recombinaison RecA

Chez *S. pneumoniae*, l'ADN internalisé est immédiatement recouvert par la protéine SsbB afin de le protéger de la dégradation (Morrison *et al.*, 2007). Mais la présence de ces protéines limite l'accès de RecA à l'ADNsb et limite donc l'intégration par recombinaison homologue de l'ADN internalisé dans le génome de la bactérie hôte. Chez la bactérie *E. coli*, la voie RecFOR permet de charger RecA sur des discontinuités simple brin de l'ADN. La question du rôle de RecFOR dans le chargement de RecA sur l'ADNsb internalisé au cours de la transformation s'est donc posée chez les bactéries naturellement compétentes, l'absence des protéines RecFOR a un effet modeste sur le taux de transformation chromosomique (diminution d'environ 25 % pour les mutants *recF* et *recR* et de 50 % pour les mutants *recO* chez *B. subtilis*) (Kidane *et al.*, 2012), ce qui indique qu'une autre protéine pourrait être impliquée dans ce processus lors de la transformation.

Des études chez *S. pneumoniae* ont été menées afin de déterminer si DprA pouvait jouer un rôle dans le chargement de la protéine RecA sur l'ADNsb couvert de SsbB et si elle fait partie comme RecFOR de la famille des RMPs (Recombination Mediator Protein), médiateurs qui favorisent la nucléation de RecA sur l'ADNsb. Dans un premier temps, il a été montré lors d'expériences *in vitro* et par microscopie à force atomique que la protéine ^{Sp}DprA est capable de se fixer sur de l'ADNsb recouvert par la protéine SSB de *E. coli*. Si la protéine RecA de *E. coli* est ajoutée, un nucléofilament ^{Ec}RecA-ADNsb-^{Sp}DprA se forme alors qu'il n'y a pas formation d'un nucléofilament ^{Ec}RecA-ADNsb en absence de ^{Sp}DprA. Il est donc proposé que DprA fasse partie de la famille des RMPs et soit capable de charger RecA sur l'ADNsb et de rompre l'effet inhibiteur de SSB sur la nucléation de RecA sur l'ADNsb (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). Une interaction physique entre les protéines DprA et RecA de *B. subtilis* ou de *S. pneumoniae* a également été mise en évidence par double hybride chez la levure

ainsi que par co-immunoprécipitation (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). La résolution de la structure 3D de ^{Sp}DprA et ^{Sp}RecA et l'étude de mutants ont permis de mettre en évidence les résidus impliqués dans l'interaction entre DprA et RecA (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012, Lisboa, 2014 #3890).

Il est par contre probable que RecO et/ou RecFOR soient nécessaires au chargement de RecA sur l'ADNsb en absence de DprA comme le montre l'aggravation du phénotype d'un double mutant *dprA recO* chez *B. subtilis* (Kidane *et al.*, 2012, Yadav *et al.*, 2013). En revanche, RecO est nécessaire lors de la transformation plasmidique chez *B. subtilis*, la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique est diminuée de 97% en absence de RecO alors qu'elle n'est pas ou très peu affectée dans un mutant $\Delta recA$, $\Delta recF$ ou $\Delta recR$ (Yadav *et al.*, 2012, Kidane *et al.*, 2009). L'activité d'appariement simple brin (SSA) de RecO serait nécessaire à l'assemblage des fragments de plasmide et à la reconstitution d'un plasmide double brin circulaire capable de se répliquer dans la cellule hôte.

La fixation de ^{Sp}DprA sur l'ADNsb forme des complexes de haut poids moléculaires et l'analyse au microscope à force atomique de ces structures montre que ^{Sp}DprA favorise la juxtaposition de molécules d'ADN (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). De plus ^{Sp}DprA étant capable de se fixer sur de l'ADN surenroulé négativement, il a été proposé un rôle de DprA dans la juxtaposition du nucléofilament RecA-ADNsb-DprA avec le chromosome grâce à la fixation de DprA sur le chromosome et des interactions DprA/DprA afin de faciliter la recherche d'homologie et l'échange de brins (Mortier-Barriere *et al.*, 2007). Une fois que le fragment d'ADN est intégré par recombinaison dans le chromosome de la bactérie hôte, les protéines DprA et RecA sont libérées et peuvent prendre en charge un nouveau fragment d'ADNsb protégé par SsbB. Un modèle résume les différentes étapes du devenir de l'ADN internalisé chez *S. pneumoniae* (Figure 62).

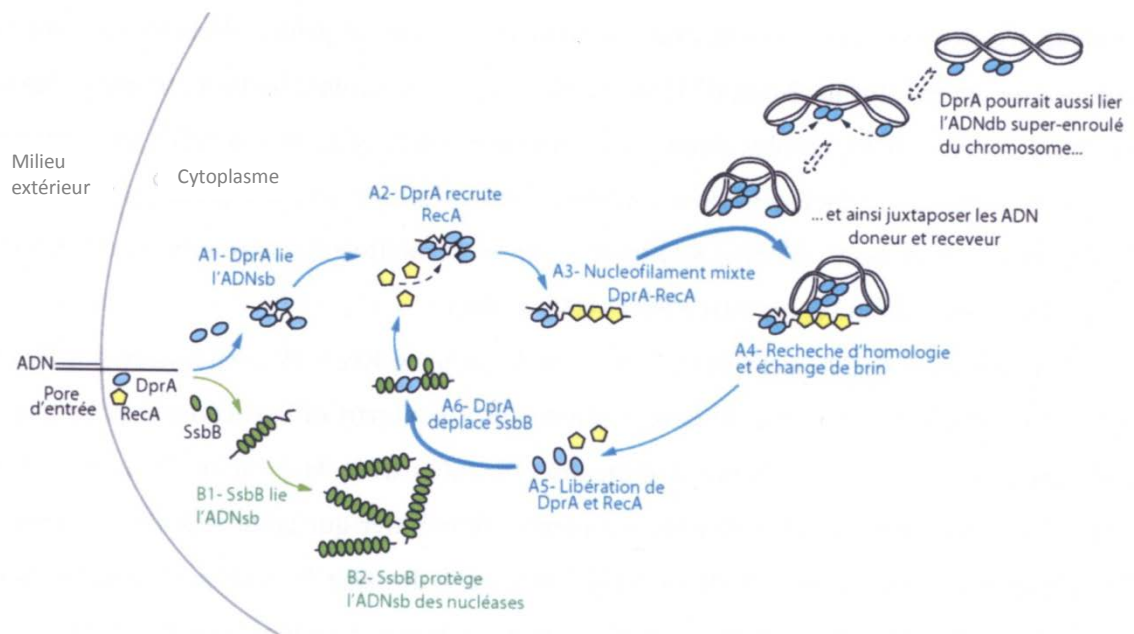


Figure 62 : Devenir de l'ADNsb internalisé durant la transformation génétique naturelle chez *S.pneumoniae* (Attaiech, 2009).

c) Le rôle de DprA dans la régulation de la compétence

Comme il a été dit plus haut, *B. subtilis* et *S. pneumoniae* ne sont compétentes que lors d'une courte période et à un moment du cycle cellulaire précis. Dans les deux espèces, l'état de compétence implique une cascade de régulation (Figure 63). Un peptide « phéromone », CSP chez *S. pneumoniae* et ComX chez *B. subtilis*, est exporté hors de la cellule. Un système de régulation à deux composants détecte ce peptide puis transmet un signal qui conduit à l'activation de régulateurs regroupant de nombreux gènes impliqués dans la transformation (pour revue (Claverys *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2006, Johnsborg & Havarstein, 2009)).

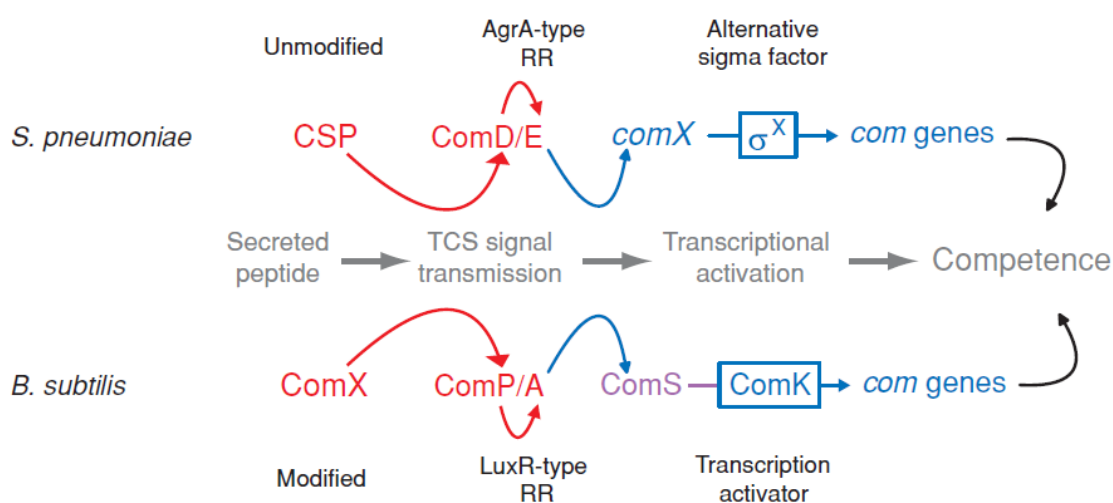


Figure 63 : L'induction de la compétence chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, des circuits similaires mais qui ont évolué indépendamment (Claverys *et al.*, 2006).

En rouge : les signaux entre cellules, en bleu : les activations transcriptionnelles, en mauve : les contrôles posttraductionnels. Voir le texte pour les détails du modèle.

Chez *B. subtilis*, un peptide ComX est exporté hors de la cellule et sa reconnaissance par ComP, une histidine kinase induit le transfert du groupe phosphorylé sur ComA. ComA~P active la transcription de plusieurs gènes dont *comS*. La protéine ComS préserve ComK de la dégradation par des protéases. ComK est un activateur de transcription impliqué dans l'expression de gènes de compétence tardifs (Figure 63).

Chez *S. pneumoniae* (Figures 63 et 64), la fixation du peptide CSP sur ComD, une histidine kinase, induit son autophosphorylation puis le transfert du groupe phosphorylé sur ComE. ComE~P induit l'expression de gènes précoces dont les gènes *comCDE* codant pour le peptide CSP, et le système à deux composants ComDE. De cette manière le signal est amplifié et permet l'induction de la compétence des bactéries voisines. Un autre gène précoce induit est *comX* codant pour un facteur σ

de transcription alternatif qui induit à son tour l'expression des gènes tardifs dont les gènes codant pour la machinerie d'internalisation (ComEG, ComEC, ComFA) et les protéines nécessaires à la prise en charge de l'ADN internalisé et à la recombinaison (SsbB, DprA, RecA). *comW* lui code pour une protéine protégeant la protéine ComX d'un clivage protéolytique (pour revue (Johnsborg & Havarstein, 2009, Claverys *et al.*, 2006)). Il a récemment été montré que DprA joue un rôle dans la fermeture de la compétence (Figure 64). DprA se fixerait par sa région N-terminale sur les dimères ComE~P fixés sur les régions promotrices puis la dimérisation de DprA dans sa région C-terminale provoquerait une dissociation des dimères ComE~P ce qui entrainerait la perte de l'expression des gènes *com* précoces et permettrait la fermeture de la compétence (Weng *et al.*, 2013, Mirouze *et al.*, 2013).

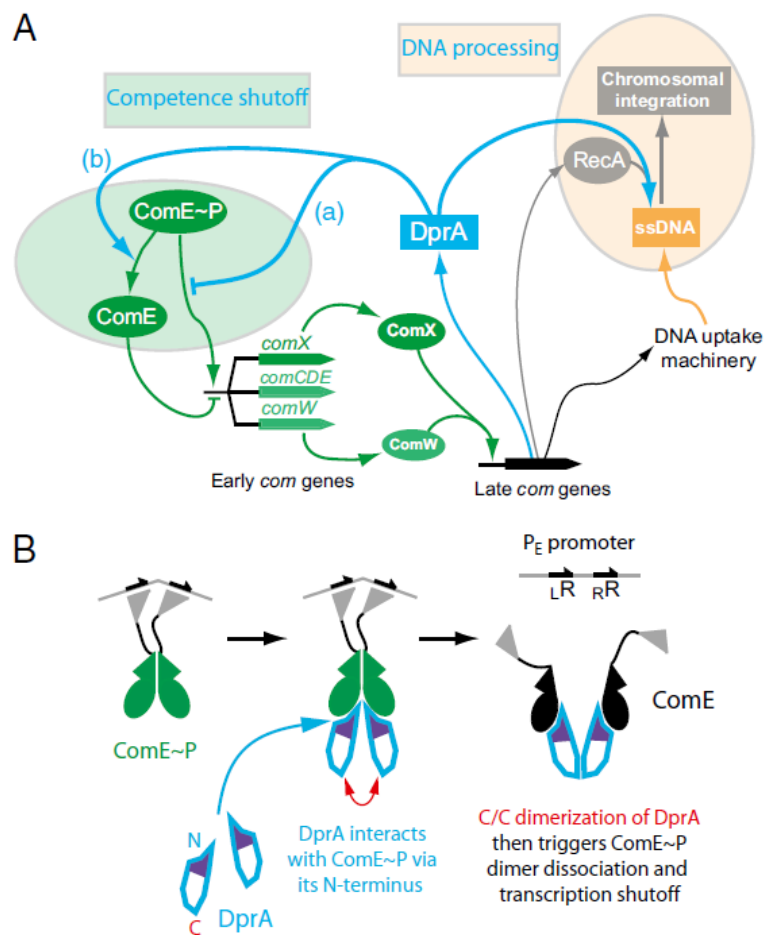


Figure 64 : Rôle de DprA dans la régulation de la compétence chez *S. pneumoniae* (Mirouze *et al.*, 2013).

(A) DprA a deux rôles lors de la transformation : la prise en charge de l'ADN internalisé en le protégeant et en chargeant la protéine RecA afin de l'intégrer dans le génome de la cellule hôte et la fermeture de la compétence en modifiant la quantité de protéine ComE phosphorylée (a) ou en agissant comme un anti-activateur (b). (B) Modèle d'action de DprA sur ComE~P.

4. *Deinococcus radiodurans*, une bactérie naturellement compétente

La compétence naturelle de *D. radiodurans* a été mise en évidence par Moseley et ses collègues entre les années 60 et 80 (Moseley & Setlow, 1968, Tigrari & Moseley, 1980) ce qui a permis par la suite de développer de nombreux outils génétiques faisant de cet organisme une espèce facilement manipulable en laboratoire. Cependant, la transformation en tant que telle et les mécanismes impliqués dans ce processus chez *D. radiodurans* ont été peu étudiés.

Récemment, des résultats obtenus au laboratoire ont mis en évidence un rôle de DdrB dans la transformation plasmidique (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011).

Les cellules dépourvues de DdrB ont une efficacité réduite d'un facteur 100 pour la transformation par de l'ADN plasmidique, un processus qui nécessite probablement pour l'établissement du plasmide dans la cellule, comme chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* (Saunders & Guild, 1981, Kidane *et al.*, 2009), l'appariement des fragments d'ADNs internalisés, pour reconstituer un ADN double brin circulaire après comblement des discontinuités simple brin (Figure 55) (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). Alors que chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, c'est la protéine RecO qui, par son activité dans l'appariement simple brin, joue un rôle majeur dans l'établissement des plasmides, chez *D. radiodurans*, c'est la protéine DdrB qui assume majoritairement cette fonction, l'efficacité de transformation par de l'ADN plasmidique ne diminuant que d'un facteur 6 dans des cellules dépourvues de la protéine RecO (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011).

Le mécanisme impliqué dans l'établissement dans la cellule d'ADN génomique internalisé fait appel à l'activité recombinase de la protéine RecA. L'absence de RecA entraîne une diminution importante de l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique chez *D. radiodurans* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). Par contre, l'absence de RecO ou de RecR a un effet beaucoup plus marginal sur la transformation par de l'ADN génomique, la réduction de l'efficacité de transformation se limitant respectivement à un facteur environ 3 (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). Ceci pose donc la question du chargement de RecA sur l'ADNs internalisé et du rôle que pourrait jouer la protéine DprA à cette étape.

II. Problématique

La protéine DprA joue un rôle central dans la transformation chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, à la fois pour protéger l'ADN simple-brin internalisé et pour faciliter le chargement de la protéine RecA sur cet ADN simple-brin couvert de SSB. Un homologue du gène *dprA* (*DR_0120*) est présent dans le génome de *D. radiodurans*. Je me suis donc intéressée à l'implication de la protéine DprA dans la transformation naturelle de *D. radiodurans* par de l'ADN chromosomique et plasmidique. J'ai également voulu déterminer si d'autres protéines comme DdrB, ou le complexe RecFOR pouvaient jouer un rôle de substitution en son absence. Comme DdrB semble être la protéine majoritairement impliquée dans la transformation plasmidique chez *D. radiodurans* mais qu'en son absence, la transformation n'est pas totalement abolie, j'ai également posé la question du rôle des protéines DprA, RecO, RecF dans ces événements résiduels.

Pour cela, les fréquences de transformation par de l'ADN génomique provenant d'une souche de *D. radiodurans* résistante à la rifampicine ou par un plasmide conférant la résistance à la spectinomycine sont mesurées dans différents contextes mutants.

Parmi les homologues de DprA présents chez les bactéries naturellement transformables, il existe trois types d'organisation : un domaine constitue le cœur de la protéine, puis selon l'espèce, des domaines Nter et Cter peuvent être présents individuellement ou ensemble. Pourquoi une telle variation structurale à travers les espèces, pour des homologues dont le rôle premier est le même : prise en charge de l'ADN internalisé, lever de la barrière SSB, recrutement de RecA ? Chez *D. radiodurans*, les trois domaines sont présents, nous nous sommes donc interrogés sur les rôles de ces domaines N-terminal et C-terminal et nous nous sommes demandé si la présence de ces domaines était strictement requise pour la fonctionnalité de la protéine. Pour cela, des souches portant des délétions dans le gène *dprA* exprimant des versions tronquées de ^{Dr}DprA (une protéine DprA dépourvue de sa région N-terminale (acides aminés 2 à 82) et une autre sans la région C-terminale (acides aminés 307 à 369) ont été construites par remplacement allélique au locus du gène sauvage par la version tronquée. Les souches obtenues ont ensuite été testées pour leur efficacité de transformation.

D'autres questions se posent quant à la diversité structurale des différents homologues de DprA. Si ces protéines ont un même rôle dans les différentes espèces naturellement transformables, la question de leur interchangeabilité se pose, en particulier si elles n'ont pas la même organisation structurale que la protéine ^{Dr}DprA. Pour cela, les gènes homologues de *S. pneumoniae* et *H. pylori*, ^{Sp}*dprA* et ^{Hp}*dprA* étiquetés ou non et le gène ^{Dr}*dprA* ont été clonés dans un vecteur d'expression sous

le contrôle d'un promoteur *Pspac*. L'objectif est d'introduire ces plasmides exprimant les protéines DprA hétérologues dans une souche de *D. radiodurans* puis de déléter le gène ^{Dr}*dprA* chromosomique afin d'effectuer des tests de transformation et de déterminer si l'expression des protéines ^{Dr}DprA, ^{Sp}DprA ou ^{Hp}DprA complémente le défaut dans la transformation de bactéries *D. radiodurans* portant une délétion du gène *dprA*.

Nous testerons également l'effet d'une mutation *dprA* dans la radiorésistance en établissant la courbe de survie de bactéries dépourvues de DprA après exposition à des doses croissantes de rayons γ .

L'ensemble de ces travaux devrait nous permettre de mieux définir les rôles respectifs des protéines DprA, RecA, RecO et DdrB dans la transformation chez la bactérie *D. radiodurans*.

III. Résultats et discussion

1. Etude du rôle de la protéine DprA dans la transformation chez *D. radiodurans*.

A. Rôle de DprA dans la transformation par de l'ADN génomique

Comme attendu, la transformation de la bactérie *D. radiodurans* par de l'ADN génomique qui nécessite l'intégration de l'ADN internalisé dans le génome de la bactérie réceptrice est un mécanisme presque totalement dépendant de la protéine RecA (Figure 65) (diminution de l'efficacité de transformation d'un facteur 233 en absence de RecA). On remarque toutefois que la recombinaison chromosomique n'est pas totalement abolie dans un mutant $\Delta recA$ avec une fréquence de bactéries [Rif^R] de $5,6 \cdot 10^{-7}$ restant supérieure à la fréquence de mutagenèse spontanée [Rif^R] ($6 \cdot 10^{-8}$ bactéries/mL).

Les niveaux d'implication de RecA dans la transformation sont différents selon les espèces et selon le type d'ADN introduit par transformation. En effet, chez *B. subtilis*, l'absence de RecA abolit totalement l'intégration de l'ADN génomique dans la cellule hôte mais n'affecte quasiment pas la transformation plasmidique (Kidane *et al.*, 2009). En revanche, chez *S. pneumoniae*, la protéine RecA est essentielle dans ces deux processus (Martin *et al.*, 1995). Chez *D. radiodurans*, la protéine RecA n'est pas ou peu impliquée dans la transformation par de l'ADN plasmidique et la transformation par de l'ADN génomique est réduite d'un facteur 233 montrant un nombre non négligeable de transformants dans une souche réceptrice dépourvue de RecA. Il existe donc chez *D. radiodurans* d'autres protéines ou mécanismes qui contribuent à l'intégration chromosomique d'ADN exogène dans une souche dépourvue de RecA. La protéine RadA, homologue de RecA est exprimée chez *D. radiodurans* et il a été proposé qu'elle participe dans l'invasion de brin lors du mécanisme ESDSA nécessaire à la réparation du génome après irradiation. Elle pourrait donc être un candidat dans ces événements de transformation par de l'ADN génomique RecA-indépendants. De plus, RadA est impliquée dans la transformation par de l'ADN génomique chez d'autres espèces. Elle est induite lors de la compétence chez *S. pneumoniae* et son absence réduit la transformation d'un facteur 100 (Burghout *et al.*, 2007). Chez *B. subtilis*, elle n'est pas induite mais son absence réduit la transformation d'un facteur 10 à 37 (Carrasco *et al.*, 2002, Kruger *et al.*, 1997).

Afin de regarder si RadA joue un rôle dans la transformation chez *D. radiodurans*, nous avons mesuré la fréquence de transformation dans des souches dépourvues de RadA et dans des souches dépourvues de RadA et de RecA. Les résultats montrent que RadA n'est pas impliquée dans la transformation chez *D. radiodurans* même en absence de RecA (Figure 65).

Comme chez les autres bactéries naturellement compétentes (*S. pneumoniae*, *H. pylori*), l'absence de DprA chez *D. radiodurans* entraîne une diminution de plus de 100 fois de l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique. Alors que le laboratoire a montré le rôle majeur de RecFOR dans l'initiation de la réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA et a proposé que RecFOR soit nécessaire au chargement de la protéine RecA sur l'ADN simple brin, je montre ici que l'absence des protéines RecF et RecO diminue modestement d'un facteur 2 et 3,5 l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique suggérant qu'une ou d'autres protéines sont capables de favoriser le chargement de RecA sur l'ADN simple-brin internalisé (Figure 65). Nous suggérons que DprA intervienne chez *D. radiodurans* comme chez *S. pneumoniae* dans le chargement de RecA sur l'ADN simple brin internalisé au cours de la transformation par de l'ADN génomique. Il est à noter que dans un contexte mutant $\Delta dprA$, la transformation par de l'ADN génomique n'est pas totalement abolie et que des événements d'intégration de l'ADN génomique dans le chromosome indépendants de DprA sont encore observés. La voie RecFOR pourrait être impliquée dans ces événements résiduels.

Afin de tester cette hypothèse, l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique a été mesurée dans des doubles mutants $\Delta dprA \Delta recF$ et $\Delta dprA \Delta recO$. Chez le premier, une faible aggravation (réduction d'un facteur 2) du phénotype d'un mutant $\Delta dprA$ est observée alors que dans un mutant $\Delta dprA \Delta recO$, la transformation par de l'ADN génomique est totalement abolie, la fréquence de bactéries [Rif^R] mesurée après transformation dans un double mutant $\Delta dprA \Delta recO$ étant du même ordre de grandeur que la fréquence de mutants [Rif^R] présents de façon spontanée dans une culture (de l'ordre de 6.10^{-8}) (Mennecier *et al.*, 2006) et témoin sans ADN dans nos expériences de transformation) (Figure 65). Nos résultats montrent que parmi les événements ayant lieu en absence de DprA, une petite proportion semble impliquer la voie RecFOR mais c'est principalement RecO indépendamment de RecF qui semble intervenir dans un mécanisme de secours. Il a déjà été proposé que RecOR puisse seul charger RecA sur les extrémités d'ADN simple brin générées par RecQ et RecJ ((Handa *et al.*, 2009); voir Figure 16). Il est probable que lors de l'internalisation d'ADNsb en absence de DprA, le complexe RecOR soit suffisant au chargement de RecA sur l'ADNsb internalisé indépendamment de RecF. Il faudrait pour cela étudier la fréquence de transformation dans un double mutant $\Delta dprA \Delta recR$.

Une autre protéine, la protéine DdrB, spécifique des *Deinococcaceae*, est connue chez *D. radiodurans* pour avoir une activité de type SSA en plus de son activité SSB-like (Xu *et al.*, 2010). Il a été montré précédemment (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) et confirmé ici que, en présence de DprA, l'absence de DdrB n'a aucune influence sur l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique. Pourtant, de façon très intéressante, j'ai pu montrer ici qu'en absence de DprA, la

protéine DdrB joue un rôle majeur dans la transformation par de l'ADN génomique (fréquence des bactéries [Rif^R] mesurée après transformation réduite au même niveau que la fréquence de mutants spontanés [Rif^R] dans une culture) (Figure 65). Ceci suggère que DdrB pourrait jouer, du fait de ses propriétés SSB-like un rôle majeur en absence de DprA dans la protection de l'ADNsb internalisé au cours de la transformation. Sa présence serait par contre une barrière pour le chargement de RecA. En absence de DprA, RecO est requise pour maintenir une fréquence résiduelle de transformation. Nous proposons que l'ADN internalisé couvert par DdrB soit pris en charge par RecO pour déplacer DdrB et faciliter le chargement de RecA.

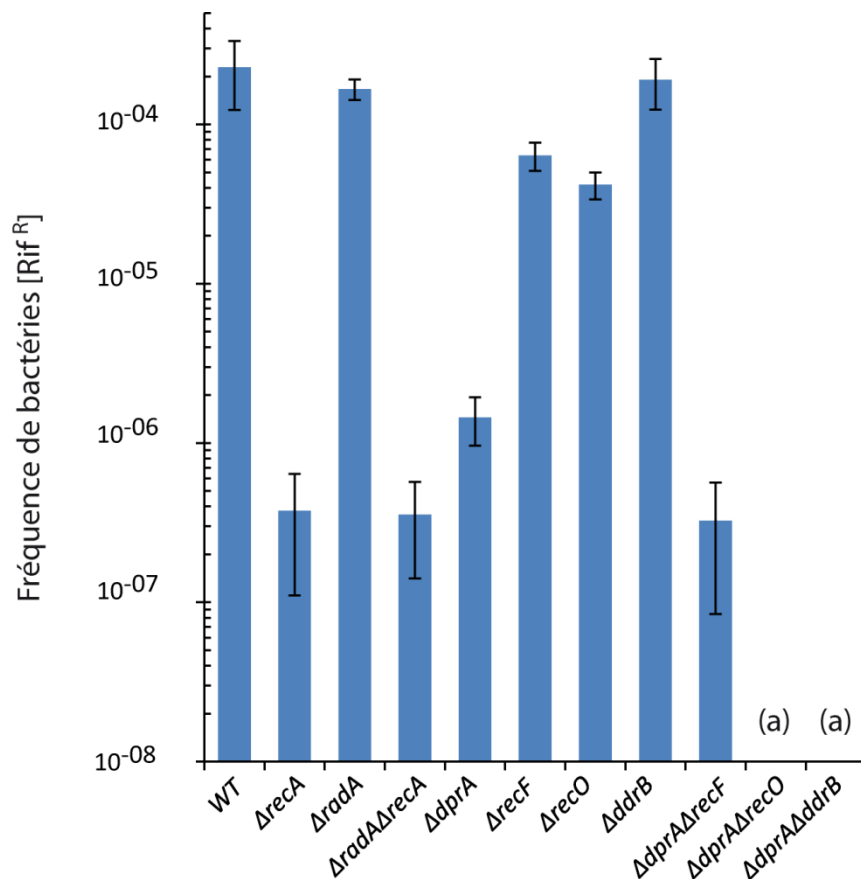


Figure 65 : Fréquence de transformation par de l'ADN génomique chez différentes souches mutantes de *D. radiodurans*.

Des cellules en phase exponentielle de croissance sont transformées comme indiqué dans le matériel et méthodes par 200 ng d'ADN génomique extrait d'une souche résistante à la rifampicine. (a) La fréquence spontanée de bactéries [Rif^R] est de 6.10^{-8} bactéries/mL.

B. Rôle de DprA dans la transformation par de l'ADN plasmidique

Comme attendu et déjà montré au laboratoire (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011), on observe, que l'efficacité de transformation par de l'ADN plasmidique est peu affectée (diminution d'un facteur 3 ou 4) si la souche réceptrice est dépourvue de la protéine RecA (Figure 66). Lors de la transformation par de l'ADN plasmidique, l'établissement du plasmide à partir des fragments d'ADNsb internalisé nécessite la reconstitution d'un ADN circulaire via l'appariement de régions simple brin complémentaires et le comblement des brèches simple brin par une ADN polymérase donc l'intervention de protéines ayant une activité SSA comme RecO ou DdrB. Il s'avère que chez *D.radiodurans*, c'est probablement la protéine DdrB, qui est majoritairement impliquée dans cette étape puisque la fréquence de transformation est diminuée de 65 fois dans un mutant $\Delta ddrB$ contre seulement 7 fois dans un mutant $\Delta recO$ (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) et ce travail, Figure 66).

DprA semble moins impliquée dans la transformation par de l'ADN plasmidique que dans la transformation par de l'ADN génomique avec une diminution de la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique de 15 fois en absence de DprA. Par contre, le défaut de transformation s'aggrave avec une diminution supplémentaire de la fréquence de transformation de 7 et 15 fois si l'absence de DprA est respectivement associée à une absence de RecO ou de RecF. Il est intéressant de noter que la transformation par de l'ADN plasmidique n'est pas totalement inhibée en absence de DprA ou en absence de DdrB, mais, de façon très intéressante, j'ai pu montrer ici qu'en absence de DprA, la protéine DdrB joue un rôle essentiel dans la transformation par de l'ADN plasmidique, la fréquence de bactéries [Spc^R] obtenues suite à la transformation par le plasmide pGY11559 conférant la résistance à la spectinomycine étant du même ordre de grandeur ($9 \cdot 10^{-8}$ bactéries/mL) que la fréquence de mutants spontanés [Spc^R] dans une culture. Ces résultats sont cohérents avec l'inhibition chez des bactéries dépourvues de DdrB et DprA de la transformation par de l'ADN génomique décrite ci-dessus. Ceci suggère que DdrB pourrait jouer, du fait de ses propriétés SSB-like un rôle majeur en absence de DprA dans la protection de l'ADNsb internalisé, que celui-ci soit d'origine plasmidique ou génomique.

DdrB serait donc, en absence de DprA, impliqué à deux niveaux dans la transformation par de l'ADN plasmidique (1) protection de l'ADNsb contre la dégradation du fait de ses propriétés SSB-like (2) établissement du plasmide grâce à son activité SSA.

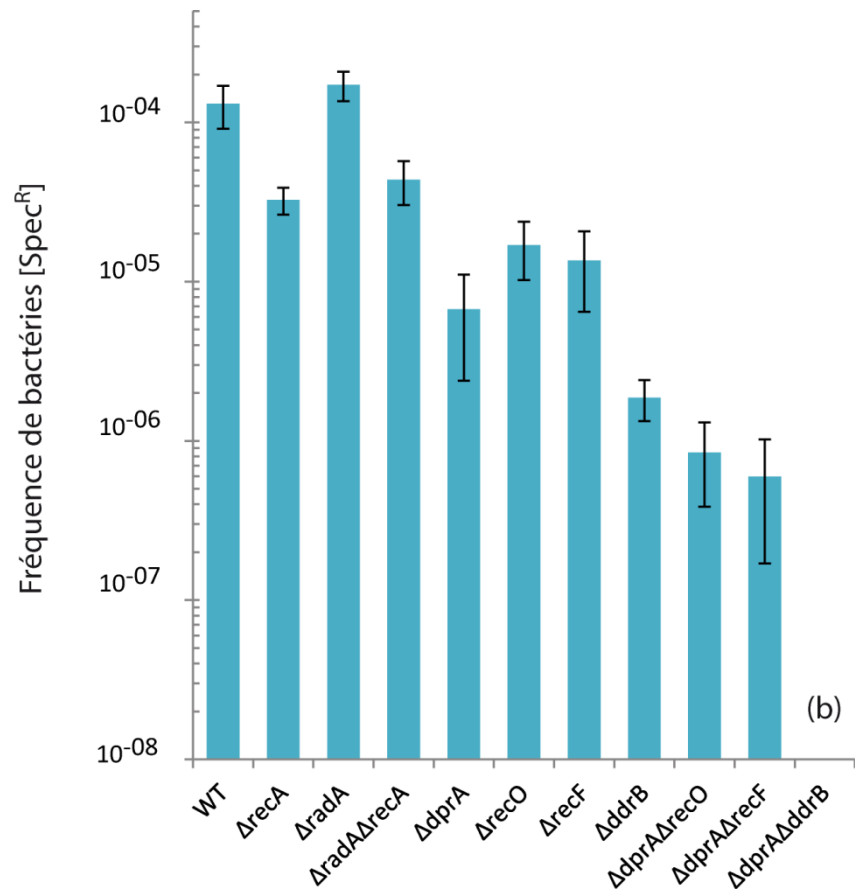


Figure 66 : Fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique chez différentes souches mutantes de *D. radiodurans*.

Des cellules en phase exponentielle de croissance sont transformées comme indiqué dans le matériel et méthodes par 200 ng d'ADN plasmidique conférant la résistance à la spectinomycine. (b) La fréquence spontanées de bactéries [Spc^R] est de $9 \cdot 10^{-8}$ bactéries/mL.

L'implication de DprA dans les mécanismes de transformation varie selon les espèces et le type d'ADN utilisé pour la transformation. Le phénotype conféré par l'absence de *dprA* entraîne une disparition totale de transformation chez *S. pneumoniae* (Berge *et al.*, 2003) une diminution de 90 à 95 % de la transformation chromosomique ou plasmidique chez *B. subtilis* et *H. pylori* (Yadav *et al.*, 2012, Smeets *et al.*, 2000) et une diminution de 10 000 fois de la transformation par de l'ADN génomique uniquement chez *H. influenzae* (Karudapuram *et al.*, 1995). Chez *D. radiodurans*, DprA est principalement impliquée dans la transformation par de l'ADN génomique. Celle-ci est diminuée d'un facteur 133 en absence de *dprA* mais n'est pas totalement abolie. Ce phénotype très différent de ceux observés chez les espèces citées ci-dessus montre que chez *D. radiodurans*, d'autres voies/protéines permettent la protection de l'ADN internalisé et son intégration d'ADN dans le chromosome lors de la transformation. Quant à son implication dans la transformation par de l'ADN plasmidique, le phénotype est aussi très différent de ceux déjà observés chez d'autres espèces. L'implication n'est pas nulle chez *D. radiodurans* contrairement à chez *H. influenzae* puisque la transformation est diminuée de 15 fois en absence de DprA mais est loin d'être d'une importance primordiale comme chez *S. pneumoniae*, *B. subtilis* ou encore *H. pylori*. Ces phénotypes très variés chez toutes ces espèces sont probablement le reflet de l'existence et de l'efficacité d'autres protéines capables de suppléer à l'absence de DprA selon l'espèce.

Ici nous avons montré que DdrB semble avoir un rôle important dans la protection de l'ADNsb internalisé dans la cellule, qu'il soit d'origine génomique ou plasmidique et notamment en absence de DprA. A la différence de *S. pneumoniae* chez lequel il y a deux protéines SSB, SsbA et SsbB, la deuxième étant induite lors de la compétence, il n'y a qu'une seule protéine de type SSB, chez *D. radiodurans*, qui est essentielle. On peut donc se demander si chez *D. radiodurans*, SSB protège l'ADNsb internalisé lors de la transformation pour former le complexe d'éclipse et si DprA déplace SSB pour protéger l'ADNsb et charger RecA. En absence de DprA, DdrB pourrait participer à la protection de l'ADNsb comme SSB ce qui nécessiterait l'intervention de RecO pour déplacer l'une ou l'autre de ces protéines pour permettre ensuite le chargement de RecA. Il serait intéressant de comparer le taux de dégradation de l'ADNsb internalisé chromosomique et plasmidique dans des souches sauvages, et dépourvues de DprA ou de DdrB ou des deux en même temps.

2. Rôle des domaines N terminal et C terminal de la protéine ^{Dr}DprA dans la transformation chez *D. radiodurans*.

Si la présence d'un homologue DprA/Smf est commune à *D. radiodurans*, *S. pneumoniae* et *H. pylori*, la structure de cette protéine est bien différente chez ces trois espèces. ^{Dr}DprA possèdent deux extra-domaines, en position N-ter et C-ter, en plus du domaine central très conservé de type Rossman Fold, tandis qu'un seul de ces domaines est présent pour ^{Sp}DprA et ^{Hp}DprA (Figures 57 et 58). De manière générale, c'est la structure à 3 domaines qui est la plus retrouvée. Pour le moment, seuls les domaines N-ter et central de *S. pneumoniae* ont pu être associés à une fonction, rôle dans la fermeture de la compétence pour le premier (Mirouze *et al.*, 2013), interaction DprA-DprA et DprA-RecA pour le second (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2012, Lisboa *et al.*, 2014). L'étude par RMN du domaine C-ter de ^{Hp}DprA par nos collaborateurs, J. Lisboa et S. Cheruel (travail non publié, (Lisboa, 2013)), révèle une structure de type Helice-Tour-Helice, généralement impliquée dans l'interaction avec de l'ADN. Cependant, ils n'ont pas pu mettre en évidence cette interaction *in vitro*.

Nous nous sommes interrogés sur les rôles de ces domaines N-ter et C-ter chez *D. radiodurans* en étudiant la transformation dans des souches exprimant des versions tronquées de ^{Dr}DprA dépourvues du domaine N-terminal (acides aminés 2 à 82) ou du domaine C-terminal (acides aminés 307 à 370) (voir matériel et méthodes). Nous avons aussi étudié si la protéine DprA de *S. pneumoniae* pouvait compléter une souche de *D. radiodurans* dépourvue de DprA.

A. Etude des domaines protéiques de ^{Dr}DprA

Pour construire les souches exprimant des versions tronquées de ^{Dr}DprA, des délétions ont été introduites au locus dans le gène ^{Dr}dprA permettant d'exprimer des versions tronquées de la protéine ^{Dr}DprA, une ayant perdu ses 80 premiers acides aminés (Δ Nter) et une ayant perdu ses 63 derniers acides aminés (Δ Cter). L'expression et la stabilité des protéines tronquées pouvant être modifiée par rapport à celle de la protéine sauvage, des souches exprimant des versions fusionnées à une étiquette HA ont été construites afin de vérifier l'expression des protéines par Western Blot. Les souches obtenues ont ensuite été transformées comme précédemment par de l'ADN génomique [Rif^R] et plasmidique [Sp^R].

De manière intéressante, les phénotypes observés sont différents selon le domaine absent (Figure 67).

En absence du domaine Nter de DprA, l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique (Figure 67A) est réduite de 105 fois, conférant un phénotype identique à celui d'une souche dépourvue de DprA. Par contre, l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique diminue de façon moindre (facteur 7) en absence du domaine Cter (Figure 67A). Les résultats sont différents si on considère l'effet de ces délétions sur l'efficacité de transformation par de l'ADN plasmidique (Figure 67B) : l'absence du domaine Cter n'affecte en rien cette efficacité de transformation alors que l'absence du domaine Nter induit un phénotype identique à celui observé dans un mutant $\Delta dprA$. Les résultats obtenus dans les souches exprimant la protéine ^{Dr}DprA sauvage et les versions tronquées avec une étiquette HA sont les mêmes que ceux obtenus dans des souches exprimant les protéines sans étiquette. L'étiquette HA ne modifie donc en rien la fonctionnalité de ces protéines (Figure 67).

Pour écarter une hypothèse triviale liée à l'absence d'expression des protéines tronquées, expliquant le phénotype des mutants $dprA\Delta Nter$, nous avons vérifié le niveau d'expression des protéines tronquées dans les cellules (Figure 68).

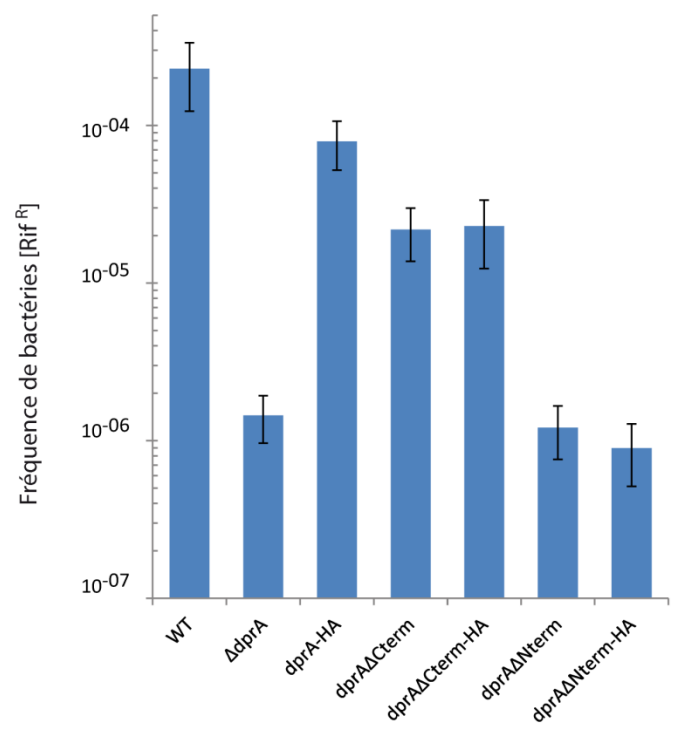
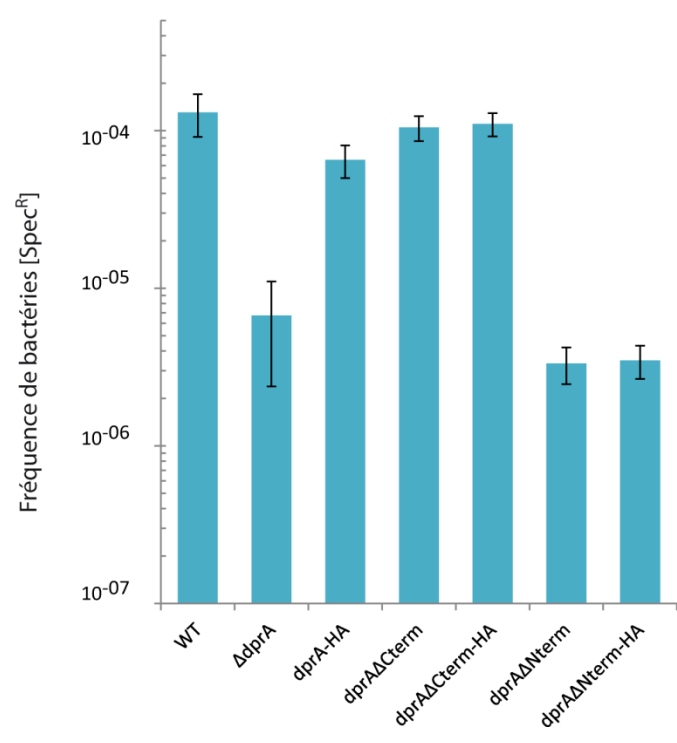
A**B**

Figure 67 : Effet de la délétion des domaines N-terminal ou C-terminal sur la fréquence de transformation par de l'ADN génomique ou plasmidique.

(A) Transformation par de l'ADN génomique. (B) Transformation par de l'ADN plasmidique.

La concentration cellulaire de la protéine sauvage et des versions tronquées de Dr DprA a été mesurée par Western-Blot (Figure 68). Pour cela, nous avons regardé l'expression des protéines dans des cellules cultivées jusqu'à $DO_{650} = 0,4$, correspondant à la DO utilisée pour la préparation des cellules compétentes. Alors que Dr DprA (41 kDa) et Dr DprA Δ Cter (35 kDa) sont détectées par Western Blot dans des quantités similaires, aucune protéine Dr DprA Δ Nter (33 kDa) n'est détectée. L'absence de transformants dans des souches où la région du gène *dprA* codant la région Nter de la protéine a été délétée est donc probablement due au fait que la protéine Dr DprA Δ Nter n'est pas ou très peu exprimée ou très instable. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La méthode de construction de la souche nécessitant l'introduction d'une cassette de résistance en amont du promoteur de *dprA* pourrait perturber l'expression du gène *dprA*. Pour tester cette hypothèse, nous souhaitons exprimer la protéine sauvage ainsi que les versions tronquées dans un système d'expression différent à partir d'un plasmide et sous le contrôle du promoteur *Pspac*. On peut également envisager qu'un ARN messager soit produit mais que par la suite, le domaine Nter soit nécessaire au bon repliement de la protéine ou à sa stabilité et que l'absence du domaine Nter pourrait entraîner la dégradation rapide de la protéine. L'expression du gène *dprA* et des versions tronquées pourraient être analysées et comparées par des expériences de RT-QPCR.

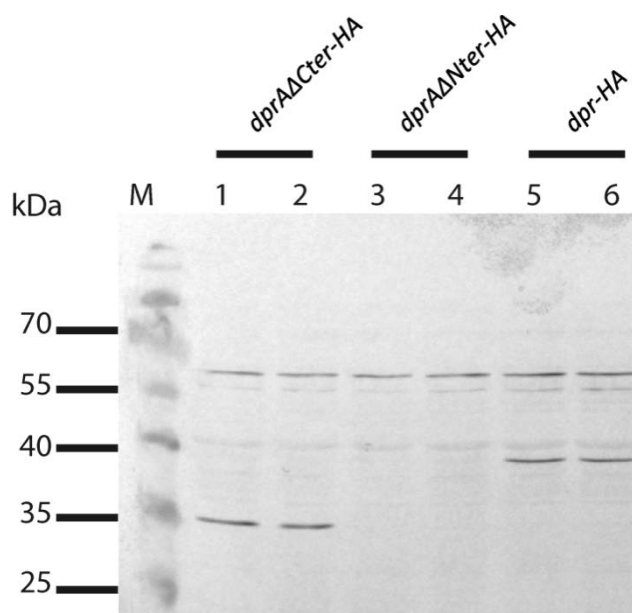


Figure 68 : Vérification de l'expression des protéines Dr DprA, Dr DprA Δ Cter et Dr DprA Δ Nter par Western Blot.

10 μ g d'extrait brut de protéines extraites de cellules cultivées jusqu'à $DO_{650} = 0,4$ (2 clones différents par souche) ont été déposés sur un gel d'acrylamide (4,5%/12%) puis transférés sur une membrane PVDF. La détection des protéines est effectuée grâce à un anticorps primaire dirigé contre l'étiquette HA produit dans le lapin et un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline. La révélation est effectuée grâce aux réactifs NBT et BCIP. Les tailles attendues des protéines fusionnées à l'étiquette HA sont : 41 kDa pour Dr DprA (5 et 6), 35 kDa pour Dr DprA Δ Cter (1 et 2) et 33 kDa pour Dr DprA Δ Nter (3 et 4). Les protéines Dr DprA et Dr DprA Δ Cter sont exprimées en quantité similaire tandis que l'expression de la protéine Dr DprA Δ Nter n'est pas détectée. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de 3 expériences indépendantes.

B. Complémentation inter-espèces

D'autres questions se posent quant à la diversité structurelle des différents homologues de DprA. Puisque ces protéines ont un même rôle de base, l'expression d'un homologue n'ayant qu'un des deux domaines Nter ou Cter, peut-il restaurer un phénotype d'un mutant $\Delta dprA$ de *D. radiodurans* ? Pour cela, les gènes homologues $^{Sp}dprA$ et $^{Hp}dprA$ ont été clonés dans un vecteur d'expression sous le contrôle d'un promoteur *Pspac* avec ou sans étiquette HA. Nous avons ensuite introduit chaque plasmide dans une souche de *D. radiodurans* puis nous avons délété le gène $^{Dr}dprA$ chromosomique afin d'effectuer des tests de transformation et de déterminer si l'expression des gènes $^{Sp}dprA$ et $^{Hp}dprA$ chez *D. radiodurans* est capable de compléter le défaut dans la transformation de bactéries privées de $^{Dr}DprA$. Le test de complémentation n'a pour le moment été effectué que pour $^{Sp}DprA$ lors de la transformation chromosomique (Figure 69).

Pour témoin, $^{Dr}DprA$ a également été exprimée *in vivo* à partir du même vecteur dans une souche $\Delta dprA$ et l'efficacité de transformation a été mesurée (Figure 69). Les résultats montrent que l'expression ectopique de $^{Dr}DprA$ à partir du plasmide ne rétablit pas complètement l'efficacité de transformation par de l'ADN génomique (facteur de réduction inférieur à 2). En revanche, l'expression de $^{Sp}DprA$ à partir du plasmide ne permet pas de compenser l'absence de $^{Dr}DprA$. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés en mesurant l'expression de $^{Sp}DprA$ chez *D. radiodurans*. Pour cela, des Western-Blot pourront être réalisés grâce aux constructions qui permettent d'exprimer les protéines fusionnées avec une étiquette HA.

On peut aussi émettre l'hypothèse que les domaines N-ter de $^{Dr}DprA$ et $^{Sp}DprA$ n'ont probablement pas le même rôle chez ces deux espèces. L'étude des domaines des homologues de DprA pourrait se poursuivre en exprimant des protéines chimères à partir de $^{Dr}DprA$. On pourrait ainsi remplacer le domaine N-ter de *D. radiodurans* par celui de *S. pneumoniae* et/ou le domaine C-ter par celui de *H. pylori* et regarder le phénotype pour la transformation des souches exprimant ces formes chimères.

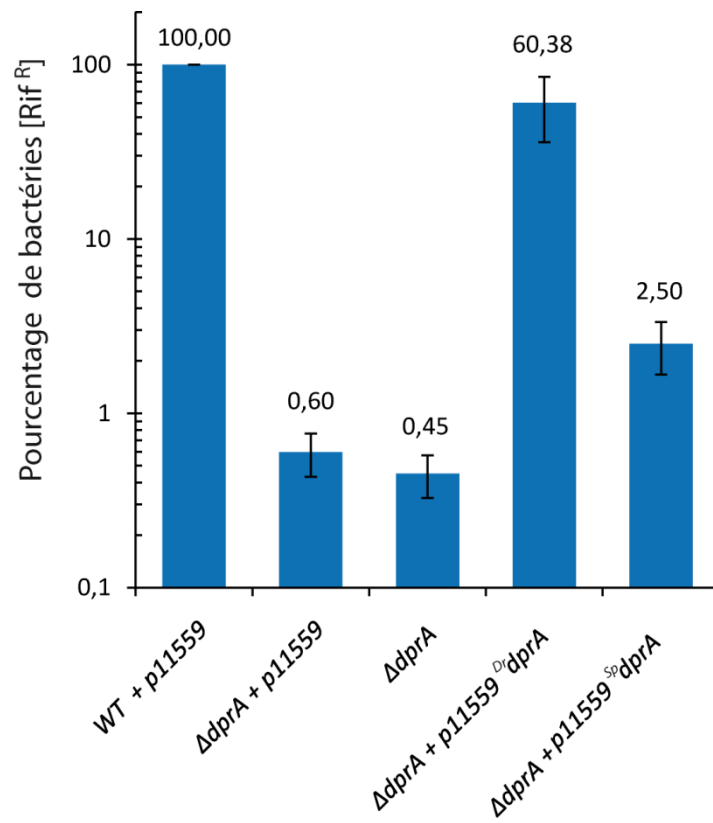


Figure 69 : Test de complémentation d'un mutant ^{Dr} *dprA* par l'expression de ^{Sp} *dprA*.

3. Transformation et radiorésistance

Après exposition des bactéries aux rayons γ , il a été montré que des fragments d'ADN sont excrétés à l'extérieur des cellules (Vukovic-Nagy *et al.*, 1974). L'internalisation d'une partie de cet ADN pourrait fournir de la matière première pour la réparation du génome en fournissant de l'ADN homologue ou en reconstituant un pool de nucléotides. Dans ce premier cas, DprA en prenant en charge l'ADN extracellulaire internalisé pourrait participer à la radiorésistance. Du fait de sa capacité à protéger de l'ADNsb, elle pourrait également participer à la reconstitution du génome après irradiation. Afin de tester cette hypothèse, des courbes de survie après exposition à des doses allant de 5 à 15 kGy de rayons γ ont été réalisées (Figure 70).

L'absence de DprA n'entraîne pas de baisse notable de la radiorésistance de *D. radiodurans* à des doses allant de 0 à 15 kGy de rayonnement γ . DprA ne semble donc pas participer à l'efficacité de reconstitution du génome après irradiation chez *D. radiodurans*. Cependant, il existe peut-être un autre lien entre la compétence et la radiorésistance, du moins entre des protéines prédites comme étant impliquées dans la compétence et la radiorésistance. En effet, des études transcriptomiques (Liu *et al.*, 2003) ont montré que le gène *DR_0207*, dont l'annotation prédit une protéine ComEA, est parmi les 10 gènes les plus induits après irradiation. Parmi d'autres gènes moins fortement induits, on retrouve *DR_0361* codant pour un homologue de ComEC. De plus, Vukovic *et al.* en 1974, montrent que des fragments d'ADN d'environ 1000 pb sont expulsés de la cellule immédiatement après irradiation. On peut donc imaginer que chez *D. radiodurans*, les protéines impliquées dans l'internalisation de l'ADN lors de la compétence comme ComEA et ComEC soient utilisées non plus pour internaliser l'ADN mais pour l'expulser de la cellule après exposition à des rayonnements ionisants. Ce phénomène permettrait à la cellule de se débarrasser de l'ADN trop endommagé ne pouvant pas être utilisé pour la réparation du génome. Il serait donc intéressant d'étudier la transformation et la radiorésistance dans des souches mutées pour ces gènes.

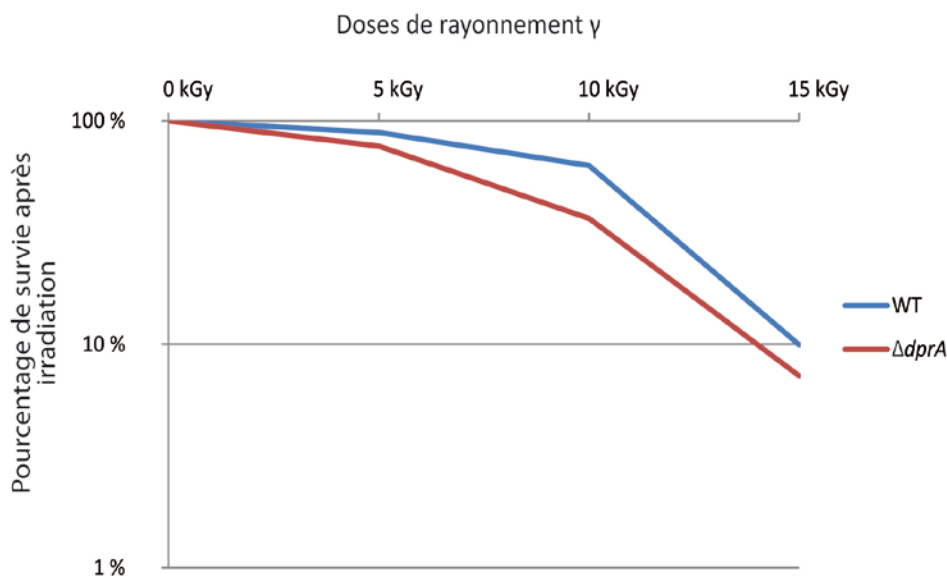


Figure 70 : Courbe de survie d'une mutant dprA à l'exposition aux rayons γ .

IV. Conclusion

La transformation est principalement étudiée chez *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, et *H. pylori*. La transformation suscite un intérêt particulier chez ces deux dernières du fait que ce sont des bactéries pathogènes pour l'Homme et que leur forte adaptabilité à leur environnement est en partie due à une variabilité génétique élevée. La compétence participe à cette forte adaptabilité et génère de nouvelles souches résistantes aux antibiotiques via des transferts de gènes de résistance. Les gènes impliqués dans la transformation seraient une cible potentielle pour le développement de nouveaux traitements. Chez *D. radiodurans*, les résultats de mon travail en collaboration avec Jonhny Lisboa et Sophie Quevillon-Cheruel montrent une importance de DprA dans la transformation. Ces résultats montrent aussi que les phénotypes observés dans différents mutants chez *D. radiodurans* et en fonction de l'origine de l'ADN transformé sont différents de ceux observés chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*. Ceci implique que la transformation bactérienne, bien que répandue, est loin d'être un phénomène strictement transposable d'une espèce à une autre et que son étude dans différents organismes permettra d'en comprendre les subtilités. Cela permettra aussi de comprendre comment les différents acteurs impliqués dans un même mécanisme ont pu diverger ou au contraire évoluer dans le même sens selon les espèces.

La transformation permet chez *D. radiodurans* une variabilité génétique et une adaptabilité à l'environnement. Par contre la transformation ne semble pas être un mécanisme lié à la radiorésistance chez *D. radiodurans*.

V. Matériel et Méthodes

1. Tableau de souches et plasmides, culture des souches

Les souches et plasmides utilisés lors de ce travail sont répertoriés dans le Tableau 6.

D.radiodurans est cultivé soit en milieu liquide TGY 2X (bacto tryptone 1%, extrait de levure 0.6% et glucose 0.2%) à 30°C en aérobiose et sous agitation, soit en milieu solide TGY 1X + 1.5% d'agar. Si besoin, les milieux sont supplémentés par des antibiotiques à raison de 3,5 µg/mL de chloramphénicol, 75 µg/mL de spectinomycine, et 6 µg/mL de kanamycine. Les souches d'*E.coli* sont cultivées en milieu liquide LB (bacto tryptone 1%, extrait de levure 0,5% et NaCl 1%) ou en milieu solide LB + 1,6% d'agar à 37°C en présence de spectinomycine 40 µg/mL lorsque nécessaire.

2. Construction des souches et plasmides

A. Construction des simples et double mutants

La souche $\Delta dprA$ a été construite par remplacement allélique du gène *dprA* par une cassette de résistance à la kanamycine par la méthode de ligation tripartite. Les fragments de PCR du gène de résistance à la kanamycine amplifié à partir du plasmide p11086 et des régions en 5' et en 3' du gène *dprA* amplifiés à partir de l'ADN de la souche de référence ATCC 13939 (GY9613) sont digérés par les enzymes de restriction appropriées (sites de restrictions insérés dans les oligonucléotides) puis assemblés par ligation. Le mélange de ligation est ensuite utilisé pour transformer la souche sauvage rendue compétente (Figure 71A).

La souche *dprA-HA* a également été construite par la méthode de ligation tripartite entre un fragment de la région 3' du gène *dprA* sans les trois nucléotides finaux du codon stop, un fragment contenant l'étiquette HA suivie du gène de résistance à la kanamycine amplifié à partir du plasmide p14002 et un fragment de la région en 3' du gène *dprA* (Figure 71B).

Le double mutant $\Delta dprA \Delta ddrB$ a été construit par transformation de la souche $\Delta ddrB$ par de l'ADN génomique de la souche $\Delta dprA$. Les doubles mutants $\Delta dprA \Delta recO$ et $\Delta dprA \Delta recA$ ont été construits respectivement par transformation de la souche $\Delta dprA$ par de l'ADN génomique des souches $\Delta recO$ ou $\Delta recA$.

Toutes les souches mutantes ont été striées plusieurs fois sur milieu sélectif afin d'obtenir des souches homozygotes. Des analyses par PCR ont été réalisées pour vérifier le génotype des souches.

Souches bactériennes	Génotypes et descriptions	Sources ou références
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 ,Souche utilisée pour le clonage	Disponible au laboratoire
SCS110	rpsL (Str) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ Δ M15],Hôte pour les plasmides avant introduction dans <i>D.radiodurans</i>	Disponible au laboratoire
<i>D. radiodurans</i>		
GY9613	Souche R1, ATCC 13939 utilisées pour construire toutes les autres souches <i>D. radiodurans</i>	Disponible au laboratoire
GY11733	<i>rpoB</i> $_{\Delta 1250-1258}$, Rif ^R , souche utilisée pour extraire l'ADN [Rif ^R]	Disponible au laboratoire
GY15121	Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i>	Construite lors de ce travail
GY16054	<i>dprA</i> -HA Ω <i>kan</i>	Construite lors de ce travail
GY12835	Δ <i>ddrB</i> Ω <i>cat</i>	Construite au laboratoire
GY16203	Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i> , Δ <i>ddrB</i> Ω <i>cat</i>	Construite lors de ce travail
GY12965	Δ <i>recF</i> Ω <i>cat</i>	Bentchikou et al., 2009
GY12968	Δ <i>recA</i> Ω <i>kan</i>	Bentchikou et al., 2009
GY16052	Δ <i>recO</i> Ω <i>cat</i>	Construite lors de ce travail
GY16084	Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i> , Δ <i>recF</i> Ω <i>cat</i>	Construite lors de ce travail
GY16086	Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i> , Δ <i>recO</i> Ω <i>cat</i>	Construite lors de ce travail
GY12958	Δ <i>radA</i> Ω <i>cat</i>	Disponible au laboratoire
GY15970	Δ <i>radA</i> Ω <i>cat</i> , Δ <i>recA</i> Ω <i>kan</i>	Disponible au laboratoire
GY16058	<i>dprA</i> Δ Cter Ω <i>cat</i> , délétion nucléotides 919 à 1110.	Construite lors de ce travail
GY16205	<i>dprA</i> Δ Cter-HA Ω <i>kan</i> , délétion nucléotides 919 à 1113, fusion traductionnelle avec étiquette HA.	Construite lors de ce travail
GY16056	<i>dprA</i> Δ Nter Ω <i>cat</i> , délétion nucléotides 1 à 246.	Construite lors de ce travail
GY16201	<i>dprA</i> Δ Nter-HA Ω <i>kan</i> , délétion nucléotides 1 à 246, fusion traductionnelle avec étiquette HA.	Construite lors de ce travail
GY14142	R1, p11559	Disponible au laboratoire
GY14150	GY15121(Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i>) + p11559	Collaboration Johnny Lisboa
GY14151	GY15121(Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i>) ^{Dr} <i>dprA</i> ⁺ , p15020	Construite lors de ce travail
GY16059	GY15121(Δ <i>dprA</i> Ω <i>kan</i>) ^{Sp} <i>dprA</i> ⁺ , p15009	Construite lors de ce travail
Plasmides		
pPS6	Porteur de la cassette de résistance au chloramphénicol	Disponible au laboratoire
p11086	Porteur de la cassette de résistance à la kanamycine	Disponible au laboratoire
p11559	Vecleur navette <i>E. coli</i> / <i>D. radiodurans</i> , Spc ^R	Disponible au laboratoire
p14002	Vecleur navette <i>E. coli</i> / <i>D. radiodurans</i> , Spc ^R , dérivé du p11559 permettant par clonage l'étiquetage HA.	Disponible au laboratoire
p15010	p11559 XhoI/DraI + ^{Hb} <i>dprA</i>	Construit lors de ce travail
p15011	p14002 NdeI/DraI + ^{Sp} <i>dprA</i>	Construit lors de ce travail
p15012	p14002 NdeI/DraI + ^{Dr} <i>dprA</i>	Construit lors de ce travail
p15013	p14002 NdeI/DraI + ^{Hb} <i>dprA</i>	Construit lors de ce travail
p15009	p11559 XhoI/DraI + ^{Sp} <i>dprA</i>	Collaboration Johnny Lisboa
p15020	p11559 NdeI/DraI+ ^{Dr} <i>dprA</i>	Construit lors de ce travail

Tableau 8 : Souches d'*E.coli* et de *D.radiodurans* et plasmides utilisés dans ce travail.

B. Construction des souches pour l'expression de protéines ^{Dr}DprA tronquées

La construction des souches exprimant des protéines tronquées de ^{Dr}DprA a été réalisée par ligation tripartite. Pour la délétion du domaine N-terminal, les acides aminés 2 à 82 (nucléotides 4 à 246) ont été délétés et pour la délétion du domaine C-terminal les acides aminés 307 à 370 (nucléotides 919 à 1110) ont été délétés. La représentation schématique des stratégies de constructions utilisées est présentée dans la Figure 71 C et D.

L'homogénéisation des souches a été effectuée par stries successives et vérifiée par PCR. Les régions génomiques modifiées ont été séquencées afin de s'assurer que les constructions sont correctes.

C. Construction des souches et plasmides pour la complémentation inter-espèces

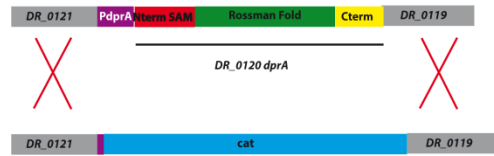
L'expression des protéines ^{Dr}DprA et ^{Sp}DprA à partir de plasmides a été réalisée par clonage des gènes ^{Dr}dprA et ^{Sp}dprA dans deux types de vecteurs : dans le plasmide p11559 au niveau des sites de clonage XhoI et DraI afin d'exprimer les protéines sous le contrôle du promoteur Pspac et dans le plasmide p14002 aux sites de clonage NdeI et DraI permettant l'expression des protéines fusionnées à l'étiquette HA sous le contrôle du promoteur Pspac (Figure 71E). Les plasmides obtenus (Tableau 8) après avoir été séquencés ont ensuite été introduits dans les souches de *D. radiodurans* Δ dprA.

3. Préparation des cellules compétentes et tests de transformation chromosomique et plasmidique

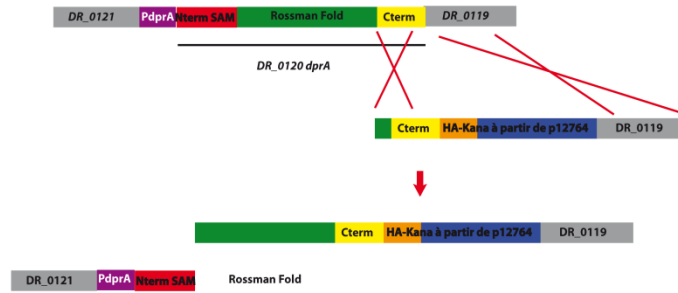
D. radiodurans est naturellement compétente, mais des stocks de cellules sont préparés puis congelés afin de procéder aux tests de transformation. Pour cela, des cultures en phase exponentielle de croissance ($DO_{650nm} \cong 0,4$) sont centrifugées puis reprises dans un milieu B (TGY2X, CaCl₂ 30mM) + du glycérol 10 % de manière à obtenir une concentration d'environ 10⁹ cellules/mL. Des aliquots sont conservés par congélation à -80°C.

Lors des tests de transformation, 100 μ L de bactéries décongelées sont incubées avec 200 ng d'ADN chromosomique extrait à partir de la souche [Rif^R] GY11733, ou de plasmide p11559 [Spc^R], dans 100 μ L de milieu B pendant 25 minutes dans de la glace, puis à 30°C avec agitation (150 RPM). Au bout d'une heure, 1mL de TGY2X est ajouté puis après 4h30 de culture avec agitation (150 RPM à 30°C), des dilutions appropriées sont étalées sur TGY et sur milieu sélectif contenant 25 μ g/mL de rifampicine ou 85 μ g/mL de spectinomycine. Le dénombrement des bactéries est effectué après 3 à 5 jours d'incubation à 30°C. 3 à 5 expériences ont été réalisées à partir d'un même lot de compétentes et d'une même préparation d'ADN chromosomique ou plasmidique.

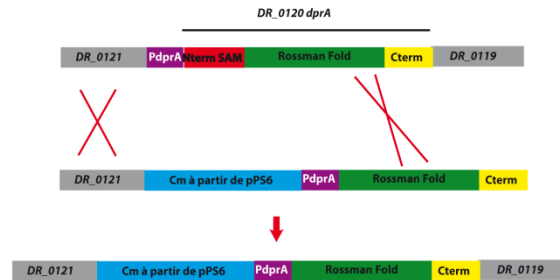
A. Stratégie de construction du mutant $\Delta dprA$



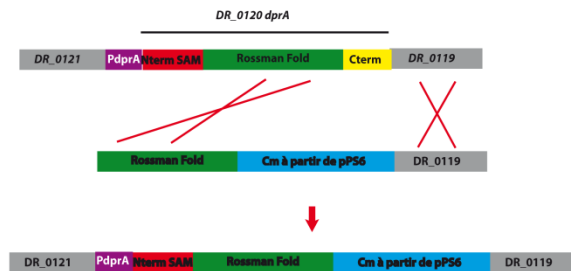
B. Stratégie de construction de la souche exprimant DprA-HA



C. Stratégie de construction de la souche exprimant DprAΔNter



D. Stratégie de construction de la souche exprimant DprAΔCter



E. Plasmide p15012

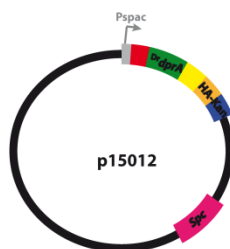


Figure 71 : Stratégies de construction des souches et de plasmides pour l'étude du rôle de D_r DprA et de ses domaines N-terminal et C-terminal dans la transformation.

4. Irradiation et courbe de survie

Les cellules de *D. radiodurans* en phase exponentielle de croissance ($0,3 < A_{650nm} < 0,8$) sont centrifugées et remises en suspension dans un volume adéquat de TGY 2X afin de concentrer les cellules et d'obtenir une A_{650nm} théorique de 20. Les cellules sont maintenues dans la glace et soumises à différentes doses d'irradiation γ . Les courbes de survie ont été réalisées au Laboratoire des Rayonnements Appliqués (LABRA) au CEA de Saclay. L'irradiateur Poséidon (^{60}Co) génère des rayonnements à un débit de dose de 6 K Gy/h. Après irradiation, 100 μL de dilution adéquate sont étalés sur milieu TGY-Agar. Les colonies sont comptées après incubation à 30°C pendant 3 à 4 jours.

5. Western Blot

Extraction des protéines :

Une culture de 10mL de *D. radiodurans* à $DO_{650nm} = 0,4$ est centrifugée 10 min à 4000 *g*. Le culot est remis en suspension dans 200 μL de SSC 1X (NaCl 0,3 M, Trisodium citrate 0,03 M pH7). Les cellules sont cassées au Fastprep en présence de 100 μl de billes (diamètre < 0,1mm) + 0.6 mL de pefabloc 100 mM (solution stock à 400mM) (inhibiteur de protéases). Après 2 min de centrifugation à 10000 *g*, le surnageant est récupéré. La quantité de protéines de l'échantillon est dosée par un dosage Bradford en utilisant le kit Bio-Rad Protein Reagent (Biorad) comme décrit par le fournisseur.

Electrophorèse :

Dix microgrammes de protéines en présence de tampon Lemmli 1X (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoethanol, 0,01% bleu de bromophénol) et de DTT 100 mM sont déposés sur un gel polyacrylamide dénaturant à 15%. La migration s'effectue en tampon Tris-Glycine + SDS 10% à 150 Volt pendant environ une heure.

Transfert des protéines sur la membrane :

Une membrane PVDF (PolyVynil DiFluoride) est trempée dans de l'éthanol 100% 10s, puis 2 min dans de l'eau milliQ et 10 min dans du tampon de transfert (Tris base 25 mM, Glycine 190 mM, Ethanol 10%, SDS 0.005%). Un montage en « sandwich » est réalisé en suivant le plan : Eponge + papier Whatman + membrane PVDF + gel + papier Whatman + éponge. Le tout est humidifié avec du tampon de transfert et mis dans un bac à migration rempli du même tampon. Le transfert s'effectue à 80 Volt pendant une heure. Après transfert, la membrane est rincée dans de l'eau milliQ pendant 5 min.

Hybridation des anticorps :

La membrane est saturée avec du tampon de blocage (TBST+lait en poudre 5%) pendant une heure puis rincée 5 min avec du TBST à température ambiante et agitation douce. Elle est mise en présence de l'anticorps primaire Anti HA (produit dans le lapin) au 1/1000^e dans du TBST+lait en poudre 3% et incubé une nuit à 4°C. La membrane est lavée quatre fois 5mn dans du TBST à température ambiante. Le deuxième anticorps (anti-IgG de lapin,) couplé à la Phosphatase Alcanine est ajouté à la membrane au 1/7500^{ème} dans du TBST + lait 3% et incubée pendant 1h à température ambiante puis rincée quatre fois 5mn dans du TBST.

Révélation :

A l'abri de la lumière, la membrane est incubée dans un mélange réactif contenant du Tris pH 9,5 (100 mM final), du NaCl (150 mM final), du MgCl₂ (1mM final), du NBT et du BCIP (dans les proportions recommandées par le fournisseur) pendant une dizaine de minutes puis rincée.

Conclusion générale

La bactérie *D. radiodurans* est connue pour sa capacité exceptionnelle à résister à l'exposition à des doses élevées d'agents génotoxiques. Elle est notamment capable de reconstituer un génome intact à partir d'une multitude de fragments d'ADN générés après exposition aux rayons γ . De part ces caractéristiques, il est communément admis que cette espèce présente une grande stabilité génétique. Cependant, plusieurs éléments nous amènent à nous poser la question de la variabilité génétique chez cette bactérie : la présence de séquences mobiles et de séquences répétées dans le génome ainsi que l'aptitude de *D. radiodurans* à pouvoir être naturellement transformée.

Plusieurs types d'IS sont retrouvées dans le génome et peuvent être présentes en plusieurs copies. Il a été montré dans notre laboratoire que les mutants spontanés résistants au triméthoprimé était majoritairement dus à la transposition de certaines IS dans le gène *thyA* (Mennecier *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent que la mutagenèse spontanée par transposition participe de façon notable à la variabilité génétique chez *D. radiodurans*. De plus, il a été montré que la transposition d'une IS, l'*ISDra2*, était fortement induite lorsqu'une grande quantité d'ADNsb était générée lors de la réparation du génome par ESDSA après exposition aux rayons γ .

Le génome de *D. radiodurans* contient un grand nombre de séquences répétées (Makarova *et al.*, 1999, Makarova *et al.*, 2001) mais il semble que peu de réarrangements soient observés lors de la réparation du génome après irradiation excepté chez des survivants après exposition à des doses extrêmes d'irradiation (25 kGy) (Repar *et al.*, 2010). En revanche l'observation de nombreux réarrangements dans des souches dépourvues de RecA et survivant après irradiation, suggère que des mécanismes RecA-indépendants soient source d'instabilité génétique (Repar *et al.*, 2010).

On remarque dans ce travail que la fréquence de recombinaison chez *D. radiodurans* entre des séquences répétées de 438 pb et espacées de 1479 à 10 500 pb introduites dans le chromosome est élevée ($6,5 \times 10^{-4}$) même en absence de stress. Elle est par ailleurs plus élevée que celle observée chez *H. pylori* avec le même type de substrat alors que cette bactérie est connue pour sa forte instabilité génétique, lui permettant une adaptation rapide à son environnement et engendrant un pouvoir pathogène élevé. J'ai également montré que l'instabilité génétique au niveau de ces régions répétées augmente chez *D. radiodurans* après exposition aux radiations. Le génome de *D. radiodurans* subit donc des réarrangements que ce soit en absence ou en présence de stress remettant en cause l'idée d'une stabilité hors norme du génome de *D. radiodurans*.

Une source majeure d'instabilité génétique au niveau de régions répétées est liée à des pauses ou des blocages de fourches de réplication se produisant dans l'environnement immédiat des séquences répétées. Ce travail nous a amenés à proposer pour la première fois des modèles de prise en charge

des fourches de réplication bloquées chez *D. radiodurans* qui pourraient conduire à la recombinaison entre les séquences répétées introduites dans le chromosome. De manière surprenante, ces résultats montrent que le SSA joue un rôle majeur dans la prise en charge des fourches bloquées en absence de RecA chez *D. radiodurans*. Cette particularité pourrait être liée à la présence chez *D. radiodurans* d'une protéine spécifique des *Deinococcaceae*, la protéine DdrB, qui possède à la fois une activité SSB-like et la capacité d'apparier des séquences d'ADN complémentaires.

L'absence combinée de RecA (ou RecO) et de DdrB a un impact majeur sur la viabilité des cellules chez *D. radiodurans*. Le lethal sectoring est augmenté par rapport aux souches dépourvues uniquement de RecA (ou de RecO). Ce phénotype est amplifié lorsque les cellules rentrent en phase stationnaire et s'aggrave en phase stationnaire prolongée. La présence de mécanismes de prise en charge des fourches bloquées impliquant RecA ou DdrB via un mécanisme de SSA semble indispensable à la viabilité cellulaire et principalement en phase stationnaire. Cette observation est à relier aux résultats non publiés de Fanny Passot qui montrent qu'en phase stationnaire, la réplication s'arrête aléatoirement n'importe où dans le génome, alors que chez d'autres bactéries la réplication ne s'arrête en phase stationnaire qu'après réplication complète du chromosome, l'arrêt complet de la réplication en phase stationnaire prolongée étant lié à l'absence de redémarrage d'un nouveau cycle de réplication à l'origine. Il est probable, mais cela reste à démontrer que des cassures double brin de l'ADN s'accumulent en phase stationnaire prolongée du fait de l'arrêt aléatoire des fourches de réplication, nécessitant les protéines de recombinaison pour rétablir un génome capable de redémarrer sa réplication après une phase de latence lorsque des cellules en phase stationnaire sont étalées sur un milieu gélosé.

D. radiodurans a un temps de génération voisin de 90 minutes ce qui est relativement long comparé à la taille de son génome. Nos travaux suggèrent que la fréquence de pause ou de blocage de fourches de réplication pouvant être à l'origine de recombinaison entre séquences répétées pourrait être plus importante que chez d'autres bactéries modèles. L'observation d'une coléthalité des mutations $\Delta recA$ et $\Delta uvrD$ ou $\Delta recO$ et $\Delta uvrD$ suggère qu'en absence d'UvrD, les problèmes répliatifs augmentent et rendent la présence des protéines de recombinaison indispensable pour sauver les fourches de réplication. Le rôle d'UvrD pour déplacer les obstacles en aval de la fourche de réplication pourrait être essentiel pour limiter les blocages de fourches de réplication dans un mutant dépourvu de RecA ou de RecO.

La démonstration de l'essentialité de RuvC suggère également l'importance de cette protéine dans la prise en charge des structures branchées générées lors de la réversion des fourches de réplication. En absence de RecBCD, RuvAB pourrait stabiliser la structure et RuvC pourrait être indispensable

pour rétablir une fourche de réplication de façon dépendante de PriA. Il serait intéressant de tester si les protéines RuvA et RuvB ont également un rôle essentiel pour la viabilité de *D. radiodurans*.

Le fait que la fréquence de recombinaison entre séquences répétées soit identique quelle que soit la distance entre les séquences répétées comprise entre 1500 et 10500 pb et la présence ou l'absence de la protéine RecA nous a amenés à poser la question de la taille des fragments d'Okazaki chez *D. radiodurans*. Une estimation indirecte de la taille de ces fragments d'Okazaki à 3,5 à 4 kb ne suffit pas pour expliquer par un mécanisme de glissement de polymérase la recombinaison entre séquences répétées éloignées de 10500 pb. Le fait que cette recombinaison soit réduite en absence de DdrB si la distance entre les séquences répétées est supérieure à 3500 pb suggère que le SSA soit impliqué dans ces remaniements, alors que les glissements de polymérase pourraient être source de remaniements si la distance entre les séquences répétées est inférieure à 3500 pb. Nos travaux sont également en faveur du rôle du SSA dans la réparation précoce des cassures double brin de l'ADN, la stimulation de la recombinaison entre les séquences répétées étant diminuée dans un mutant $\Delta ddrB$ après exposition à une dose de 5 kGy de rayonnement ionisant.

Nos travaux ouvrent de nombreuses questions concernant la progression des fourches de réplication et la prise en charge des fourches de réplication arrêtées chez la bactérie *D. radiodurans*. Ces questions n'ont jamais été abordées chez *D. radiodurans* et mériteront à l'avenir des travaux approfondis. Il est probable que des voies originales impliquant le SSA puissent jouer un rôle important pour assurer la viabilité des cellules en absence des protéines de recombinaison. Pour l'instant rien n'est connu sur le devenir des fourches de réplication bloquées chez *D. radiodurans*, ni sur la possibilité d'avoir régression de ces fourches ni sur les étapes nécessaires pour pouvoir rétablir une fourche de réplication active.

La transformation naturelle constitue une autre source de variabilité des génomes. La bactérie *D. radiodurans* est naturellement compétente. J'ai pu démontrer que la protéine DprA est impliquée dans la transformation de *D. radiodurans* et joue un rôle majeur dans la transformation par de l'ADN génomique. J'ai confirmé que la protéine DdrB spécifique des Deinococcaceae est impliquée dans la transformation par de l'ADN plasmidique et j'ai montré qu'elle devient indispensable à la transformation par de l'ADN génomique ou de l'ADN plasmidique si les cellules sont dépourvues de DprA. Il est proposé que DdrB soit impliquée dans la protection de l'ADN simple brin internalisé lorsque DprA est absente.

A travers tout ce travail, on montre que la protéine DdrB SSB-like se retrouve impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires : (1) elle participe à l'instabilité génétique des séquences répétées via le SSA, (2) elle est probablement nécessaire à la prise en charge des fourches de

réplication bloquées si les protéines de recombinaison sont absentes, (3) elle participe à la réparation précoce du génome par SSA après exposition à de fortes doses d'irradiation et (4) elle protège l'ADN internalisé au cours de la transformation de cellules réceptrices dépourvues de DprA. La protéine DdrB dont l'expression est fortement induite après irradiation joue donc un rôle dans la cellule qui va bien au-delà de son rôle dans la réparation de l'ADN. Il est probable que d'autres protéines spécifiques des *Deinococcaceae* et fortement induites après irradiation possèdent elles-aussi des fonctions qui restent à découvrir.

Références bibliographiques

- Abed, R.M., B. Zein, A. Al-Thukair & D. de Beer, (2007) Phylogenetic diversity and activity of aerobic heterotrophic bacteria from a hypersaline oil-polluted microbial mat. *Systematic and applied microbiology* 30: 319-330.
- Adzuma, K., (1998) No sliding during homology search by RecA protein. *J Biol Chem* 273: 31565-31573.
- Al-Deib, A.A., A.A. Mahdi & R.G. Lloyd, (1996) Modulation of recombination and DNA repair by the RecG and PriA helicases of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 178: 6782-6789.
- Alonso, J.C., P.P. Cardenas, H. Sanchez, J. Hejna, Y. Suzuki & K. Takeyasu, (2013) Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. *DNA Repair (Amst)* 12: 162-176.
- Anand, R.P., S.T. Lovett & J.E. Haber, (2013) Break-induced DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a010397.
- Anderson, A.W., H.C. Nordon, R.F. Cain, G. Parrish & G. Duggan, (1956) Studies on a radio-resistant *micrococcus*. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* 10: 575-578.
- Ando, T., D.A. Israel, K. Kusugami & M.J. Blaser, (1999) HP0333, a member of the *dprA* family, is involved in natural transformation in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology* 181: 5572-5580.
- Aras, R.A., J. Kang, A.I. Tschumi, Y. Harasaki & M.J. Blaser, (2003) Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13579-13584.
- Asker, D., T.S. Awad, T. Beppu & K. Ueda, (2009) *Deinococcus aquiradiocola* sp. nov., isolated from a radioactive site in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59: 144-149.
- Asker, D., T.S. Awad, L. McLandsborough, T. Beppu & K. Ueda, (2011) *Deinococcus depolymerans* sp. nov., a gamma- and UV-radiation-resistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61: 1448-1453.
- Attaiech, L., (2009) Déterminants de stabilité et de maturation de l'ADN internalisé lors de la transformation génétique naturelle chez *Streptococcus pneumoniae*. In., pp.
- Attaiech, L., A. Olivier, I. Mortier-Barriere, A.L. Soulet, C. Granadel, B. Martin, P. Polard & J.P. Claverys, (2011) Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity. *PLoS genetics* 7: e1002156.
- Ayora, S., B. Carrasco, P.P. Cardenas, C.E. Cesar, C. Canas, T. Yadav, C. Marchisone & J.C. Alonso, (2011) Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews* 35: 1055-1081.
- Aziz, K., S. Nowsheen, G. Pantelias, G. Iliakis, V.G. Gorgoulis & A.G. Georgakilas, (2012) Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* 133: 334-350.
- Baharoglu, Z. & D. Mazel, (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS microbiology reviews*.
- Baharoglu, Z., M. Petranovic, M.J. Flores & B. Michel, (2006) RuvAB is essential for replication forks reversal in certain replication mutants. *Embo Journal* 25: 596-604.
- Barrangou, R., (2015) The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current opinion in immunology* 32: 36-41.

- Basu, B. & S.K. Apte, (2012) Gamma radiation-induced proteome of *Deinococcus radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 11: M111 011734.
- Battista, J.R., (1997) Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual review of microbiology* 51: 203-224.
- Bauche, C. & J. Laval, (1999) Repair of oxidized bases in the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 181: 262-269.
- Bayles, K.W., (2014) Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. *Nature reviews. Microbiology* 12: 63-69.
- Bentchikou, E., P. Servant, G. Coste & S. Sommer, (2010) A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS genetics* 6: e1000774.
- Berge, M., I. Mortier-Barriere, B. Martin & J.P. Claverys, (2003) Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Molecular microbiology* 50: 527-536.
- Berge, M., M. Moscoso, M. Prudhomme, B. Martin & J.P. Claverys, (2002) Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 45: 411-421.
- Bhatty, M., J.A. Laverde Gomez & P.J. Christie, (2013) The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in microbiology* 164: 620-639.
- Bi, X. & L.F. Liu, (1994) recA-independent and recA-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *Journal of molecular biology* 235: 414-423.
- Bichara, M., M. Meier, J. Wagner, A. Cordonnier & I.B. Lambert, (2011) Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 727: 104-122.
- Bierne, H., M. Seigneur, S.D. Ehrlich & B. Michel, (1997) *uvrD* mutations enhance tandem repeat deletion in the *Escherichia coli* chromosome via SOS induction of the RecF recombination pathway. *Molecular microbiology* 26: 557-567.
- Blasius, M., U. Hubscher & S. Sommer, (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 221-238.
- Boling, M.E. & J.K. Setlow, (1966) The resistance of *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet radiation. 3. A repair mechanism. *Biochimica et biophysica acta* 123: 26-33.
- Bonacossa de Almeida, C., G. Coste, S. Sommer & A. Bailone, (2002) Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. *Mol Genet Genomics* 268: 28-41.
- Bork, J.M., M.M. Cox & R.B. Inman, (2001) The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA. *The EMBO journal* 20: 7313-7322.
- Bouthier de la Tour, C., S. Boissard, C. Norais, M. Toueille, E. Bentchikou, F. Vannier, M.M. Cox, S. Sommer & P. Servant, (2011) The deinococcal DdrB protein is involved in an early step of DNA double strand break repair and in plasmid transformation through its single-strand annealing activity. *DNA Repair (Amst)* 10: 1223-1231.
- Brantl, S. & N. Jahn, (2015) sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS microbiology reviews* 39: 413-427.

- Brigulla, M. & W. Wackernagel, (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Applied microbiology and biotechnology* 86: 1027-1041.
- Brissett, N.C. & A.J. Doherty, (2009) Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochemical Society transactions* 37: 539-545.
- Brooks, B.W. & R.G.E. Murray, (1981) Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol*: 353-360.
- Bruand, C., V. Bidnenko & S.D. Ehrlich, (2001) Replication mutations differentially enhance RecA-dependent and RecA-independent recombination between tandem repeats in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 39: 1248-1258.
- Budworth, H. & C.T. McMurray, (2013) A brief history of triplet repeat diseases. *Methods in molecular biology* 1010: 3-17.
- Burghout, P., H.J. Bootsma, T.G. Kloosterman, J.J. Bijlsma, C.E. de Jongh, O.P. Kuipers & P.W. Hermans, (2007) Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *Journal of bacteriology* 189: 6540-6550.
- Bzymek, M. & S.T. Lovett, (2001) Evidence for two mechanisms of palindrome-stimulated deletion in *Escherichia coli*: single-strand annealing and replication slipped mispairing. *Genetics* 158: 527-540.
- Bzymek, M., C.J. Saveson, V.V. Feschenko & S.T. Lovett, (1999) Slipped misalignment mechanisms of deletion formation: in vivo susceptibility to nucleases. *Journal of bacteriology* 181: 477-482.
- Cabiscol, E., E. Piulats, P. Echave, E. Herrero & J. Ros, (2000a) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393-27398.
- Cabiscol, E., J. Tamarit & J. Ros, (2000b) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 3: 3-8.
- Cadet, J., T. Douki & J.L. Ravanat, (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochemistry and photobiology* 91: 140-155.
- Cadet, J., S. Loft, R. Olinski, M.D. Evans, K. Bialkowski, J. Richard Wagner, P.C. Dedon, P. Moller, M.M. Greenberg & M.S. Cooke, (2012) Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free radical research* 46: 367-381.
- Callegan, R.P., M.F. Nobre, P.M. McTernan, J.R. Battista, R. Navarro-Gonzalez, C.P. McKay, M.S. da Costa & F.A. Rainey, (2008) Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 1252-1258.
- Cardenas, P.P., B. Carrasco, H. Sanchez, G. Deikus, D.H. Bechhofer & J.C. Alonso, (2009) *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase 3'-to-5' DNase activity is involved in DNA repair. *Nucleic acids research* 37: 4157-4169.
- Cardenas, P.P., T. Carzaniga, S. Zangrossi, F. Briani, E. Garcia-Tirado, G. Deho & J.C. Alonso, (2011) Polynucleotide phosphorylase exonuclease and polymerase activities on single-stranded DNA ends are modulated by RecN, SsbA and RecA proteins. *Nucleic acids research* 39: 9250-9261.

- Carrasco, B., S. Fernandez, K. Asai, N. Ogasawara & J.C. Alonso, (2002) Effect of the recU suppressors sms and subA on DNA repair and homologous recombination in *Bacillus subtilis*. *Mol Genet Genomics* 266: 899-906.
- Chanal, A., V. Chapon, K. Benzerara, M. Barakat, R. Christen, W. Achouak, F. Barras & T. Heulin, (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental microbiology* 8: 514-525.
- Chastain, P.D. & R.R. Sinden, (1998) CTG repeats associated with human genetic disease are inherently flexible. *Journal of molecular biology* 275: 405-411.
- Chedin, F., R. Dervyn, S.D. Ehrlich & P. Noirot, (1997) Apparent and real recombination frequencies in multicopy plasmids: the need for a novel approach in frequency determination. *Journal of bacteriology* 179: 754-761.
- Chen, H., G. Xu, Y. Zhao, B. Tian, H. Lu, X. Yu, Z. Xu, N. Ying, S. Hu & Y. Hua, (2008) A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS one* 3: e1602.
- Chen, I. & D. Dubnau, (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nature reviews. Microbiology* 2: 241-249.
- Christensen, E.A. & H. Kristensen, (1981) Radiation-resistance of micro-organisms from air in clean premises. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 89: 293-301.
- Christie, P.J., N. Whitaker & C. Gonzalez-Rivera, (2014) Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochimica et biophysica acta* 1843: 1578-1591.
- Claverys, J.P., M. Prudhomme & B. Martin, (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* 60: 451-475.
- Connolly, B., C.A. Parsons, F.E. Benson, H.J. Dunderdale, G.J. Sharples, R.G. Lloyd & S.C. West, (1991) Resolution of Holliday junctions in vitro requires the *Escherichia coli* *ruvC* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 6063-6067.
- Cox, J.M., S.N. Abbott, S. Chitteni-Pattu, R.B. Inman & M.M. Cox, (2006) Complementation of one RecA protein point mutation by another. Evidence for trans catalysis of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 281: 12968-12975.
- Culotta, V.C. & M.J. Daly, (2013) Manganese complexes: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast. *Antioxidants & redox signaling* 19: 933-944.
- Daly, M.J., (2006) Modulating radiation resistance: Insights based on defenses against reactive oxygen species in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Clinics in laboratory medicine* 26: 491-504, x.
- Daly, M.J., E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, J.G. Kiang, R. Fukumoto, D.Y. Lee, N.B. Wehr, G.A. Viteri, B.S. Berlett & R.L. Levine, (2010) Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS one* 5: e12570.
- Daly, M.J., E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, R.D. Leapman, B. Lai, B. Ravel, S.M. Li, K.M. Kemner & J.K. Fredrickson, (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5: e92.
- Daly, M.J., E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M.V. Omelchenko, H.M. Kostandarithes, K.S. Makarova, L.P. Wackett, J.K. Fredrickson & D. Ghosal, (2004) Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306: 1025-1028.

- Daly, M.J., O. Ling & K.W. Minton, (1994a) Interplasmidic recombination following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 176: 7506-7515.
- Daly, M.J. & K.W. Minton, (1995) Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 177: 5495-5505.
- Daly, M.J. & K.W. Minton, (1996) An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 178: 4461-4471.
- Daly, M.J. & K.W. Minton, (1997) Recombination between a resident plasmid and the chromosome following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene* 187: 225-229.
- Daly, M.J., L. Ouyang, P. Fuchs & K.W. Minton, (1994b) *In vivo* damage and *recA*-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 176: 3508-3517.
- Darmon, E., J.K. Eykelenboom, F. Lincker, L.H. Jones, M. White, E. Okely, J.K. Blackwood & D.R. Leach, (2010) *E. coli* SbcCD and RecA control chromosomal rearrangement induced by an interrupted palindrome. *Molecular cell* 39: 59-70.
- Darmon, E. & D.R. Leach, (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 1-39.
- Davies, M.J., (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications* 305: 761-770.
- Davies, M.J., (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta* 1703: 93-109.
- Davis, N.S., G.J. Silverman & E.B. Masurovsky, (1963) Radiation-Resistant, Pigmented Coccus Isolated from Haddock Tissue. *Journal of bacteriology* 86: 294-298.
- Davison, A. & D.R. Leach, (1994) The effects of nucleotide sequence changes on DNA secondary structure formation in *Escherichia coli* are consistent with cruciform extrusion *in vivo*. *Genetics* 137: 361-368.
- de Groot, A., V. Chapon, P. Servant, R. Christen, M.F. Saux, S. Sommer & T. Heulin, (2005) *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55: 2441-2446.
- Della, M., P.L. Palmboos, H.M. Tseng, L.M. Tonkin, J.M. Daley, L.M. Topper, R.S. Pitcher, A.E. Tomkinson, T.E. Wilson & A.J. Doherty, (2004) Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* 306: 683-685.
- Dennis, R.J., E. Micossi, J. McCarthy, E. Moe, E.J. Gordon, S. Kozielski-Stuhrmann, G.A. Leonard & S. McSweeney, (2006) Structure of the manganese superoxide dismutase from *Deinococcus radiodurans* in two crystal forms. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 62: 325-329.
- Devigne, A., S. Ithurbide, C. Bouthier de la Tour, F. Passot, M. Mathieu, S. Sommer & P. Servant, (2015) DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *Molecular microbiology* 96: 1069-1084.
- Devigne, A., S. Mersaoui, C. Bouthier-de-la-Tour, S. Sommer & P. Servant, (2013) The PprA protein is required for accurate cell division of gamma-irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *DNA Repair (Amst)* 12: 265-272.

- Dianov, G.L., A.V. Kuzminov, A.V. Mazin & R.I. Salganik, (1991) Molecular mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. I. Deletion formation mediated by long direct repeats. *Molecular & general genetics* : MGG 228: 153-159.
- Dillingham, M.S. & S.C. Kowalczykowski, (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 642-671, Table of Contents.
- Dubbs, J.M. & S. Mongkolsuk, (2012) Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *Journal of bacteriology* 194: 5495-5503.
- Dubnau, D., (1999) DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology* 53: 217-244.
- Duffin, P.M. & H.S. Seifert, (2010) DNA uptake sequence-mediated enhancement of transformation in *Neisseria gonorrhoeae* is strain dependent. *Journal of bacteriology* 192: 4436-4444.
- Dwyer, D.J., P.A. Belenky, J.H. Yang, I.C. MacDonald, J.D. Martell, N. Takahashi, C.T. Chan, M.A. Lobritz, D. Braff, E.G. Schwarz, J.D. Ye, M. Pati, M. Vercruysse, P.S. Ralifo, K.R. Allison, A.S. Khalil, A.Y. Ting, G.C. Walker & J.J. Collins, (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: E2100-2109.
- Earl, A.M., M.M. Mohundro, I.S. Mian & J.R. Battista, (2002a) The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *Journal of bacteriology* 184: 6216-6224.
- Earl, A.M., S.K. Rankin, K.P. Kim, O.N. Lamendola & J.R. Battista, (2002b) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *Journal of bacteriology* 184: 1003-1009.
- Eykelenboom, J.K., J.K. Blackwood, E. Okely & D.R. Leach, (2008) SbcCD causes a double-strand break at a DNA palindrome in the *Escherichia coli* chromosome. *Molecular cell* 29: 644-651.
- Farci, D., M.W. Bowler, J. Kirkpatrick, S. McSweeney, E. Tramontano & D. Piano, (2014) New features of the cell wall of the radio-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochimica et biophysica acta* 1838: 1978-1984.
- Farr, S.B. & T. Kogoma, (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological reviews* 55: 561-585.
- Fernandez-Gonzalez, E. & S. Backert, (2014) DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of gastroenterology* 49: 594-604.
- Ferreira, A.C., M.F. Nobre, E. Moore, F.A. Rainey, J.R. Battista & M.S. da Costa, (1999) Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 3: 235-238.
- Ferreira, A.C., M.F. Nobre, F.A. Rainey, M.T. Silva, R. Wait, J. Burghardt, A.P. Chung & M.S. da Costa, (1997) *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *International journal of systematic bacteriology* 47: 939-947.
- Forget, A.L. & S.C. Kowalczykowski, (2012) Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature* 482: 423-427.
- Friedrich, A., C. Prust, T. Hartsch, A. Henne & B. Averhoff, (2002) Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Applied and environmental microbiology* 68: 745-755.
- Frye, S.A., M. Nilsen, T. Tonjum & O.H. Ambur, (2013) Dialects of the DNA uptake sequence in *Neisseriaceae*. *PLoS genetics* 9: e1003458.

- Fuchs, R.P. & S. Fujii, (2013) Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a012682.
- Funayama, T., I. Narumi, M. Kikuchi, S. Kitayama, H. Watanabe & K. Yamamoto, (1999) Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* 435: 151-161.
- Furuya, E.Y. & F.D. Lowy, (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews. Microbiology* 4: 36-45.
- Galletto, R., I. Amitani, R.J. Baskin & S.C. Kowalczykowski, (2006) Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules. *Nature* 443: 875-878.
- Gao, G., D. Le, L. Huang, H. Lu, I. Narumi & Y. Hua, (2006) Internal promoter characterization and expression of the *Deinococcus radiodurans* *ppri-folP* gene cluster. *FEMS microbiology letters* 257: 195-201.
- Gerard, E., E. Jolivet, D. Prieur & P. Forterre, (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics* 266: 72-78.
- Girotti, A.W., (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* 39: 1529-1542.
- Goeders, N. & L. Van Melderen, (2014) Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins* 6: 304-324.
- Goosen, N. & G.F. Moolenaar, (2008) Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)* 7: 353-379.
- Griffith, F., (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of hygiene* 27: 113-159.
- Griffiths, E. & R.S. Gupta, (2004) Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence for the monophyletic nature of the *deinococcus-thermus* phylum. *Journal of bacteriology* 186: 3097-3107.
- Griffiths, E. & R.S. Gupta, (2007) Identification of signature proteins that are distinctive of the *Deinococcus-Thermus* phylum. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 10: 201-208.
- Gutierrez, A., L. Laureti, S. Crussard, H. Abida, A. Rodriguez-Rojas, J. Blazquez, Z. Baharoglu, D. Mazel, F. Darfeuille, J. Vogel & I. Matic, (2013) beta-Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nature communications* 4: 1610.
- Handa, N., K. Morimatsu, S.T. Lovett & S.C. Kowalczykowski, (2009) Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes & development* 23: 1234-1245.
- Hansen, M.T., (1978) Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 134: 71-75.
- Harris, D.R., M. Tanaka, S.V. Saveliev, E. Jolivet, A.M. Earl, M.M. Cox & J.R. Battista, (2004) Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol* 2: e304.
- Harsojo, S. Kitayama & A. Matsuyama, (1981) Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *J Biochem (Tokyo)* 90: 877-880.
- Hawkins, C.L. & M.J. Davies, (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1504: 196-219.
- Heinz, K. & A. Marx, (2007) Lesion bypass activity of DNA polymerase A from the extremely radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* 282: 10908-10914.

- Hirsch, P., C.A. Gallikowski, J. Siebert, K. Peissl, R. Kroppenstedt, P. Schumann, E. Stackebrandt & R. Anderson, (2004) *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica. *Systematic and applied microbiology* 27: 636-645.
- Hobbs, M.D., A. Sakai & M.M. Cox, (2007) SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J Biol Chem* 282: 11058-11067.
- Holliday, R., (1964) The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* 50: 323-335.
- Horvath, P. & R. Barrangou, (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
- Hua, X., X. Xu, M. Li, C. Wang, B. Tian & Y. Hua, (2012) Three nth homologs are all required for efficient repair of spontaneous DNA damage in *Deinococcus radiodurans*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 16: 477-484.
- Hua, Y., I. Narumi, G. Gao, B. Tian, K. Satoh, S. Kitayama & B. Shen, (2003) PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and biophysical research communications* 306: 354-360.
- Im, W.T., H.M. Jung, L.N. Ten, M.K. Kim, N. Bora, M. Goodfellow, S. Lim, J. Jung & S.T. Lee, (2008) *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 2348-2353.
- Imam, S., Z. Chen, D.S. Roos & M. Pohlschroder, (2011) Identification of surprisingly diverse type IV pili, across a broad range of gram-positive bacteria. *PLoS one* 6: e28919.
- Imlay, J.A., (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* 77: 755-776.
- Imlay, J.A., (2015) Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current opinion in microbiology* 24: 124-131.
- Ito, H., (1977) Isolation of *Micrococcus radiodurans* occurring in radurized sawdust culture media of mushroom. *Agric. Biol. Chem* 41: 35-41.
- Ivanov, E.L., N. Sugawara, J. Fishman-Lobell & J.E. Haber, (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142: 693-704.
- Iwasaki, H., M. Takahagi, A. Nakata & H. Shinagawa, (1992) *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins specifically interact with Holliday junctions and promote branch migration. *Genes & development* 6: 2214-2220.
- Iyer, R.R., A. Pluciennik, V. Burdett & P.L. Modrich, (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chemical reviews* 106: 302-323.
- Jackson, A., E.A. Okely & D.R. Leach, (2014) Expansion of CAG repeats in *Escherichia coli* is controlled by single-strand DNA exonucleases of both polarities. *Genetics* 198: 509-517.
- Ji, H.F., (2010) Insight into the strong antioxidant activity of deinoxanthin, a unique carotenoid in *Deinococcus radiodurans*. *International journal of molecular sciences* 11: 4506-4510.
- Johnsborg, O., V. Eldholm & L.S. Havarstein, (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology* 158: 767-778.
- Johnsborg, O. & L.S. Havarstein, (2009) Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS microbiology reviews* 33: 627-642.

- Jolivet, E., F. Lecointe, G. Coste, K. Satoh, I. Narumi, A. Bailone & S. Sommer, (2006) Limited concentration of RecA delays DNA double-strand break repair in *Deinococcus radiodurans* R1. *Molecular microbiology* 59: 338-349.
- Joseph, N., V. Duppatla & D.N. Rao, (2006) Prokaryotic DNA mismatch repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 81: 1-49.
- Kampfer, P., N. Lodders, B. Huber, E. Falsen & H.J. Busse, (2008) *Deinococcus aquatilis* sp. nov., isolated from water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 2803-2806.
- Kantake, N., M.V. Madiraju, T. Sugiyama & S.C. Kowalczykowski, (2002) *Escherichia coli* RecO protein anneals ssDNA complexed with its cognate ssDNA-binding protein: A common step in genetic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15327-15332.
- Karudapuram, S., X. Zhao & G.J. Barcak, (1995) DNA sequence and characterization of *Haemophilus influenzae* *dprA+*, a gene required for chromosomal but not plasmid DNA transformation. *Journal of bacteriology* 177: 3235-3240.
- Keyamura, K., C. Sakaguchi, Y. Kubota, H. Niki & T. Hishida, (2013) RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 288: 29229-29237.
- Kidane, D., S. Ayora, J.B. Sweasy, P.L. Graumann & J.C. Alonso, (2012) The cell pole: the site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47: 531-555.
- Kidane, D., B. Carrasco, C. Manfredi, K. Rothmaier, S. Ayora, S. Tadesse, J.C. Alonso & P.L. Graumann, (2009) Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS genetics* 5: e1000630.
- Kidane, D. & P.L. Graumann, (2005) Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* 122: 73-84.
- Kidane, D., H. Sanchez, J.C. Alonso & P.L. Graumann, (2004) Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Molecular microbiology* 52: 1627-1639.
- Kimura, H., R. Asada, A. Masta & T. Naganuma, (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Applied and environmental microbiology* 69: 644-648.
- Kisker, C., J. Kuper & B. Van Houten, (2013) Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a012591.
- Kitayama, S., (1982) Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. *Biochimica et biophysica acta* 697: 381-384.
- Klapstein, K., T. Chou & R. Bruinsma, (2004) Physics of RecA-mediated homologous recognition. *Biophysical journal* 87: 1466-1477.
- Kobakate, M., S. Tanabe & Hasegawa, (1973) New *Micrococcus* radioresistant red pigment, isolated from Lama glama feces, and its use as microbiological indicator of radiosterilization. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* 167: 1506-1510.
- Kobayashi, I., (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic acids research* 29: 3742-3756.
- Kow, Y.W., (1994) Base excision repair in *E. coli*--an overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 726: 178-180.

- Krabbenhoft, K.L., A.W. Anderson & P.R. Elliker, (1965) Ecology of *Micrococcus radiodurans*. *Applied microbiology* 13: 1030-1037.
- Kramer, N., J. Hahn & D. Dubnau, (2007) Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 65: 454-464.
- Kreuzer, K.N., (2013) DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a012674.
- Krisko, A. & M. Radman, (2010) Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14373-14377.
- Kristensen, H. & E.A. Christensen, (1981) Radiation-resistant micro-organisms isolated from textiles. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 89: 303-309.
- Kruger, E., T. Msadek, S. Ohlmeier & M. Hecker, (1997) The *Bacillus subtilis* clpC operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* 143 (Pt 4): 1309-1316.
- Kruger, N.J. & K. Stingl, (2011) Two steps away from novelty--principles of bacterial DNA uptake. *Molecular microbiology* 80: 860-867.
- Kunkel, T.A. & D.A. Erie, (2005) DNA mismatch repair. *Annual review of biochemistry* 74: 681-710.
- Kurahashi, H., H. Inagaki, T. Ohye, H. Kogo, T. Kato & B.S. Emanuel, (2006) Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. *DNA Repair (Amst)* 5: 1136-1145.
- Kuzminov, A., (2013) Inhibition of DNA synthesis facilitates expansion of low-complexity repeats: is strand slippage stimulated by transient local depletion of specific dNTPs? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35: 306-313.
- Lai, W.A., P. Kampfer, A.B. Arun, F.T. Shen, B. Huber, P.D. Rekha & C.C. Young, (2006) *Deinococcus ficus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Ficus religiosa* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56: 787-791.
- Leach, D.R., (1994) Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16: 893-900.
- Lecoite, F., G. Coste, S. Sommer & A. Bailone, (2004) Vectors for regulated gene expression in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene* 336: 25-35.
- Lemee, L., E. Peuchant, M. Clerc, M. Brunner & H. Pfander, (1997) Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron* 53: 919-926.
- Lenhart, J.S., J.W. Schroeder, B.W. Walsh & L.A. Simmons, (2012) DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 530-564.
- Lesterlin, C., G. Ball, L. Schermelleh & D.J. Sherratt, (2014) RecA bundles mediate homology pairing between distant sisters during DNA break repair. *Nature* 506: 249-253.
- Levin-Zaidman, S., J. Englander, E. Shimoni, A.K. Sharma, K.W. Minton & A. Minsky, (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299: 254-256.
- Lewis, N.F., (1971) Studies on a radio-resistant coccus isolated from Bombay duck (*Harpodon nehereus*). *Journal of general microbiology* 66: 29-35.
- Lewis, S.M. & A.G. Cote, (2006) Palindromes and genomic stress fractures: bracing and repairing the damage. *DNA Repair (Amst)* 5: 1146-1160.

- Li, J., E.H. Egelman & L. Craig, (2012) Structure of the *Vibrio cholerae* Type IVb Pilus and stability comparison with the *Neisseria gonorrhoeae* type IVa pilus. *Journal of molecular biology* 418: 47-64.
- Li, X. & A.L. Lu, (2001) Molecular cloning and functional analysis of the MutY homolog of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 183: 6151-6158.
- Lindsley, J.E. & M.M. Cox, (1990) Assembly and disassembly of RecA protein filaments occur at opposite filament ends. Relationship to DNA strand exchange. *J Biol Chem* 265: 9043-9054.
- Lipscomb, G.L., K. Stirrett, G.J. Schut, F. Yang, F.E. Jenney, Jr., R.A. Scott, M.W. Adams & J. Westpheling, (2011) Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Applied and environmental microbiology* 77: 2232-2238.
- Lipton, M.S., L. Pasa-Tolic, G.A. Anderson, D.J. Anderson, D.L. Auberry, J.R. Battista, M.J. Daly, J. Fredrickson, K.K. Hixson, H. Kostandarithes, C. Masselon, L.M. Markillie, R.J. Moore, M.F. Romine, Y. Shen, E. Stritmatter, N. Tolic, H.R. Udseth, A. Venkateswaran, K.K. Wong, R. Zhao & R.D. Smith, (2002) Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11049-11054.
- Lisboa, J., (2013) Etude structurale et fonctionnelle de DprA et de ses partenaires au cours de la transformation génétique. In.: Université Paris-Sud, pp.
- Lisboa, J., J. Andreani, D. Sanchez, M. Boudes, B. Collinet, D. Liger, H. van Tilbeurgh, R. Guerois & S. Quevillon-Cheruel, (2014) Molecular determinants of the DprA-RecA interaction for nucleation on ssDNA. *Nucleic acids research* 42: 7395-7408.
- Liu, Y., J. Zhou, M.V. Omelchenko, A.S. Beliaev, A. Venkateswaran, J. Stair, L. Wu, D.K. Thompson, D. Xu, I.B. Rogozin, E.K. Gaidamakova, M. Zhai, K.S. Makarova, E.V. Koonin & M.J. Daly, (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4191-4196.
- Lloyd, R.G., (1991) Conjugal recombination in resolvase-deficient *ruvC* mutants of *Escherichia coli* K-12 depends on *recG*. *Journal of bacteriology* 173: 5414-5418.
- Lloyd, R.G. & C. Buckman, (1991) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *Journal of bacteriology* 173: 1004-1011.
- Lobachev, K.S., A. Rattray & V. Narayanan, (2007) Hairpin- and cruciform-mediated chromosome breakage: causes and consequences in eukaryotic cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12: 4208-4220.
- Lovett, S.T. & A.J. Clark, (1984) Genetic analysis of the *recJ* gene of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 157: 190-196.
- Lovett, S.T., P.T. Drapkin, V.A. Suter, Jr. & T.J. Gluckman-Peskind, (1993) A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* 135: 631-642.
- Lovett, S.T. & V.V. Feschenko, (1996) Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7120-7124.

- Lovett, S.T., T.J. Gluckman, P.J. Simon, V.A. Sutter, Jr. & P.T. Drapkin, (1994) Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a recA-independent, proximity-sensitive mechanism. *Molecular & general genetics : MGG* 245: 294-300.
- Lu, H., H. Chen, G. Xu, A.M. Shah & Y. Hua, (2012) DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 11: 139-145.
- Lu, H., G. Gao, G. Xu, L. Fan, L. Yin, B. Shen & Y. Hua, (2009) *Deinococcus radiodurans* PprI switches on DNA damage response and cellular survival networks after radiation damage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8: 481-494.
- Ludanyi, M., L. Blanchard, R. Dulermo, G. Brandelet, L. Bellanger, D. Pignol, D. Lemaire & A. de Groot, (2014) Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Molecular microbiology* 94: 434-449.
- Luisi-DeLuca, C. & R. Kolodner, (1994) Purification and characterization of the *Escherichia coli* RecO protein. Renaturation of complementary single-stranded DNA molecules catalyzed by the RecO protein. *Journal of molecular biology* 236: 124-138.
- Maamar, H. & D. Dubnau, (2005) Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Molecular microbiology* 56: 615-624.
- Madian, A.G. & F.E. Regnier, (2010) Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *Journal of proteome research* 9: 3766-3780.
- Mailloux, R.J., R. Beriault, J. Lemire, R. Singh, D.R. Chenier, R.D. Hamel & V.D. Appanna, (2007) The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS one* 2: e690.
- Mailloux, R.J., R. Singh, G. Brewer, C. Auger, J. Lemire & V.D. Appanna, (2009) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology* 191: 3804-3810.
- Makarova, K.S., L. Aravind, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, K.W. Minton, E.V. Koonin & M.J. Daly, (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 44-79.
- Makarova, K.S., M.V. Omelchenko, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Lapidus, A. Copeland, E. Kim, M. Land, K. Mavrommatis, S. Pitluck, P.M. Richardson, C. Detter, T. Brettin, E. Saunders, B. Lai, B. Ravel, K.M. Kemner, Y.I. Wolf, A. Sorokin, A.V. Gerasimova, M.S. Gelfand, J.K. Fredrickson, E.V. Koonin & M.J. Daly, (2007) *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS one* 2: e955.
- Makarova, K.S., Y.I. Wolf, O. White, K. Minton & M.J. Daly, (1999) Short repeats and IS elements in the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* and comparison to other bacterial species. *Research in microbiology* 150: 711-724.
- Makharashvili, N., O. Koroleva, S. Bera, D.P. Grandgenett & S. Korolev, (2004) A novel structure of DNA repair protein RecO from *Deinococcus radiodurans*. *Structure* 12: 1881-1889.
- Mandal, T.N., A.A. Mahdi, G.J. Sharples & R.G. Lloyd, (1993) Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of ruvA, ruvB, and ruvC mutations. *Journal of bacteriology* 175: 4325-4334.
- Markillie, L.M., S.M. Varnum, P. Hradecky & K.K. Wong, (1999) Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*kata*) and superoxide dismutase (*soda*) mutants. *Journal of bacteriology* 181: 666-669.

- Marraffini, L.A. & E.J. Sontheimer, (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews. Genetics* 11: 181-190.
- Marsin, S., A. Mathieu, T. Kortulewski, R. Guerois & J.P. Radicella, (2008) Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS genetics* 4: e1000146.
- Marteinsson, V.T., S. Hauksdottir, C.F. Hobel, H. Kristmannsdottir, G.O. Hreggvidsson & J.K. Kristjansson, (2001) Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and environmental microbiology* 67: 4242-4248.
- Martin, B., P. Garcia, M.P. Castanie & J.P. Claverys, (1995) The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Molecular microbiology* 15: 367-379.
- Martin, B., Y. Quentin, G. Fichant & J.P. Claverys, (2006) Independent evolution of competence regulatory cascades in *streptococci*? *Trends in microbiology* 14: 339-345.
- Masters, C.I. & K.W. Minton, (1992) Promoter probe and shuttle plasmids for *Deinococcus radiodurans*. *Plasmid* 28: 258-261.
- Masters, C.I., B.E. Moseley & K.W. Minton, (1991) AP endonuclease and uracil DNA glycosylase activities in *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* 254: 263-272.
- Matthews, L.A. & L.A. Simmons, (2014) Bacterial nonhomologous end joining requires teamwork. *Journal of bacteriology* 196: 3363-3365.
- Mattimore, V. & J.R. Battista, (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of bacteriology* 178: 633-637.
- Mawer, J.S. & D.R. Leach, (2014) Branch migration prevents DNA loss during double-strand break repair. *PLoS genetics* 10: e1004485.
- Mazin, A.V., A.V. Kuzminov, G.L. Dianov & R.I. Salganik, (1991) Mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. II. Deletions mediated by short direct repeats. *Molecular & general genetics : MGG* 228: 209-214.
- McCready, S.J., F. Osman & A. Yasui, (2000) Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res* 451: 197-210.
- McMahill, M.S., C.W. Sham & D.K. Bishop, (2007) Synthesis-dependent strand annealing in meiosis. *PLoS Biol* 5: e299.
- Mehta, A. & J.E. Haber, (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6: a016428.
- Meima, R., H.M. Rothfuss, L. Gewin & M.E. Lidstrom, (2001) Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 183: 3169-3175.
- Mejean, V. & J.P. Claverys, (1984) Use of a cloned DNA fragment to analyze the fate of donor DNA in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 158: 1175-1178.
- Mell, J.C., I.M. Hall & R.J. Redfield, (2012) Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells. *Nucleic acids research* 40: 8536-8549.
- Mell, J.C., J.Y. Lee, M. Firme, S. Sinha & R.J. Redfield, (2014) Extensive cotransformation of natural variation into chromosomes of naturally competent *Haemophilus influenzae*. *G3* 4: 717-731.
- Mell, J.C. & R.J. Redfield, (2014) Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *Journal of bacteriology* 196: 1471-1483.
- Melville, S. & L. Craig, (2013) Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 323-341.

- Menetski, J.P. & S.C. Kowalczykowski, (1985) Interaction of recA protein with single-stranded DNA. Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors. *Journal of molecular biology* 181: 281-295.
- Mennecier, S., G. Coste, P. Servant, A. Bailone & S. Sommer, (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Genet Genomics* 272: 460-469.
- Mennecier, S., P. Servant, G. Coste, A. Bailone & S. Sommer, (2006) Mutagenesis via IS transposition in *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* 59: 317-325.
- Merlin, C. & A. Toussaint, (1999) Les éléments transposables bactériens. *Société Française de Génétique* 15.
- Meulenbroek, E.M., C. Peron Cane, I. Jala, S. Iwai, G.F. Moolenaar, N. Goosen & N.S. Pannu, (2013) UV damage endonuclease employs a novel dual-dinucleotide flipping mechanism to recognize different DNA lesions. *Nucleic acids research* 41: 1363-1371.
- Meyer, A., J. Deiana & A. Bernard, (2004). In: Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. W. Kluwer (ed). pp. 173.
- Michel, B., (2000) Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends in biochemical sciences* 25: 173-178.
- Michel, B., H. Boubakri, Z. Baharoglu, M. LeMasson & R. Lestini, (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* 6: 967-980.
- Minton, K.W. & M.J. Daly, (1995) A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17: 457-464.
- Mirouze, N., M.A. Berge, A.L. Soulet, I. Mortier-Barriere, Y. Quentin, G. Fichant, C. Granadel, M.F. Noirot-Gros, P. Noirot, P. Polard, B. Martin & J.P. Claverys, (2013) Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E1035-1044.
- Mitchell, A.H. & S.C. West, (1994) Hexameric rings of *Escherichia coli* RuvB protein. Cooperative assembly, processivity and ATPase activity. *Journal of molecular biology* 243: 208-215.
- Mitchell, A.H. & S.C. West, (1996) Role of RuvA in branch migration reactions catalyzed by the RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271: 19497-19502.
- Morimatsu, K. & S.C. Kowalczykowski, (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Molecular cell* 11: 1337-1347.
- Morimatsu, K. & S.C. Kowalczykowski, (2014) RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: E5133-5142.
- Morrison, D.A., (1977) Transformation in *pneumococcus*: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *Journal of bacteriology* 132: 576-583.
- Morrison, D.A., (1978) Transformation in *pneumococcus*: protein content of eclipse complex. *Journal of bacteriology* 136: 548-557.
- Morrison, D.A. & B. Mannarelli, (1979) Transformation in *pneumococcus*: nuclease resistance of deoxyribonucleic acid in the eclipse complex. *Journal of bacteriology* 140: 655-665.

- Morrison, D.A., I. Mortier-Barriere, L. Attaiech & J.P. Claverys, (2007) Identification of the major protein component of the pneumococcal eclipse complex. *Journal of bacteriology* 189: 6497-6500.
- Mortier-Barriere, I., M. Velten, P. Dupaigne, N. Mirouze, O. Pietrement, S. McGovern, G. Fichant, B. Martin, P. Noirot, E. Le Cam, P. Polard & J.P. Claverys, (2007) A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. *Cell* 130: 824-836.
- Moseley, B.E. & J.K. Setlow, (1968) Transformation in *Micrococcus radiodurans* and the ultraviolet sensitivity of its transforming DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61: 176-183.
- Mruk, I. & I. Kobayashi, (2014) To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic acids research* 42: 70-86.
- Muller, D.J., W. Baumeister & A. Engel, (1996) Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *Journal of bacteriology* 178: 3025-3030.
- Nagy, Z. & M. Chandler, (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Research in microbiology* 155: 387-398.
- Nakamura, K., A. Okamoto, Y. Katou, C. Yadani, T. Shitanda, C. Kaweeteerawat, T.S. Takahashi, T. Itoh, K. Shirahige, H. Masukata & T. Nakagawa, (2008) Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal* 27: 3036-3046.
- Narumi, I., K. Satoh, S. Cui, T. Funayama, S. Kitayama & H. Watanabe, (2004) PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Molecular microbiology* 54: 278-285.
- Narumi, I., K. Satoh, M. Kikuchi, T. Funayama, T. Yanagisawa, Y. Kobayashi, H. Watanabe & K. Yamamoto, (2001) The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation. *Journal of bacteriology* 183: 6951-6956.
- Nguyen, H.H., C.B. de la Tour, M. Toueille, F. Vannier, S. Sommer & P. Servant, (2009) The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Molecular microbiology* 73: 240-252.
- Nikitaki, Z., C.E. Hellweg, A.G. Georgakilas & J.L. Ravanat, (2015) Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in chemistry* 3: 35.
- Nishinaka, T., Y. Ito, S. Yokoyama & T. Shibata, (1997) An extended DNA structure through deoxyribose-base stacking induced by RecA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6623-6628.
- Norais, C.A., S. Chitteni-Pattu, E.A. Wood, R.B. Inman & M.M. Cox, (2009) An alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation: The DdrB protein. *J Biol Chem*.
- Ogura, M., H. Yamaguchi, K. Kobayashi, N. Ogasawara, Y. Fujita & T. Tanaka, (2002) Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *Journal of bacteriology* 184: 2344-2351.
- Paques, F. & J.E. Haber, (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404.
- Parsons, C.A., I. Tsaneva, R.G. Lloyd & S.C. West, (1992) Interaction of *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins with synthetic Holliday junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5452-5456.

- Parsons, C.A. & S.C. West, (1993) Formation of a RuvAB-Holliday junction complex in vitro. *Journal of molecular biology* 232: 397-405.
- Passot, F.M., H.H. Nguyen, C. Dard-Dascot, C. Thermes, P. Servant, O. Espeli & S. Sommer, (2015) Nucleoid organization in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology*.
- Pasternak, C., R. Dulermo, B. Ton-Hoang, R. Debuchy, P. Siguier, G. Coste, M. Chandler & S. Sommer, (2013) ISDra2 transposition in *Deinococcus radiodurans* is downregulated by TnpB. *Molecular microbiology* 88: 443-455.
- Pasternak, C., B. Ton-Hoang, G. Coste, A. Bailone, M. Chandler & S. Sommer, (2010) Irradiation-induced *Deinococcus radiodurans* genome fragmentation triggers transposition of a single resident insertion sequence. *PLoS genetics* 6: e1000799.
- Pastwa, E. & J. Blasiak, (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta biochimica Polonica* 50: 891-908.
- Pellicic, V., (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Molecular microbiology* 68: 827-837.
- Pellegrino, S., J. Radzimanowski, D. de Sanctis, E. Boeri Erba, S. McSweeney & J. Timmins, (2012) Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure* 20: 2076-2089.
- Peng, F., L. Zhang, X. Luo, J. Dai, H. An, Y. Tang & C. Fang, (2009) *Deinococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59: 709-713.
- Persky, N.S. & S.T. Lovett, (2008) Mechanisms of recombination: lessons from *E. coli*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43: 347-370.
- Popa, O. & T. Dagan, (2011) Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current opinion in microbiology* 14: 615-623.
- Proveddi, R., I. Chen & D. Dubnau, (2001) NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 40: 634-644.
- Qiao, F. & J.U. Bowie, (2005) The many faces of SAM. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005: re7.
- Quevillon-Cheruel, S., N. Campo, N. Mirouze, I. Mortier-Barriere, M.A. Brooks, M. Boudes, D. Durand, A.L. Soulet, J. Lisboa, P. Noirot, B. Martin, H. van Tilbeurgh, M.F. Noirot-Gros, J.P. Claverys & P. Polard, (2012) Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E2466-2475.
- Ragunathan, K., C. Liu & T. Ha, (2012) RecA filament sliding on DNA facilitates homology search. *eLife* 1: e00067.
- Rainey, F.A., M. Ferreira, M.F. Nobre, K. Ray, D. Bagaley, A.M. Earl, J.R. Battista, B. Gomez-Silva, C.P. McKay & M.S. da Costa, (2007) *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57: 1408-1412.
- Rainey, F.A., K. Ray, M. Ferreira, B.Z. Gatz, M.F. Nobre, D. Bagaley, B.A. Rash, M.J. Park, A.M. Earl, N.C. Shank, A.M. Small, M.C. Henk, J.R. Battista, P. Kampfer & M.S. da Costa, (2005) Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Applied and environmental microbiology* 71: 5225-5235.

- Rajski, S.R. & R.M. Williams, (1998) DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chemical reviews* 98: 2723-2796.
- Register, J.C., 3rd & J. Griffith, (1985) The direction of RecA protein assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. *J Biol Chem* 260: 12308-12312.
- Repar, J., S. Cvjetan, D. Slade, M. Radman, D. Zahradka & K. Zahradka, (2010) RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 9: 1151-1161.
- Reyes, E.D., P.L. Patidar, L.A. Uranga, A.S. Bortoletto & S.L. Lusetti, (2010) RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions *in vitro*. *J Biol Chem* 285: 16521-16529.
- Rodriguez, R. & R. Redman, (2005) Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3175-3176.
- Roman, L.J., D.A. Dixon & S.C. Kowalczykowski, (1991) RecBCD-dependent joint molecule formation promoted by the *Escherichia coli* RecA and SSB proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 3367-3371.
- Ryder, L., G.J. Sharples & R.G. Lloyd, (1996) Recombination-dependent growth in exonuclease-depleted recBC sbcBC strains of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 143: 1101-1114.
- Ryder, L., M.C. Whitby & R.G. Lloyd, (1994) Mutation of recF, recJ, recO, recQ, or recR improves Hfr recombination in resolvase-deficient *ruv recG* strains of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 176: 1570-1577.
- Saarimaa, C., M. Peltola, M. Raulio, T.R. Neu, M.S. Salkinoja-Salonen & P. Neubauer, (2006) Characterization of adhesion threads of *Deinococcus geothermalis* as type IV pili. *Journal of bacteriology* 188: 7016-7021.
- Sampson, J.R., S. Jones, S. Dolwani & J.P. Cheadle, (2005) MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochemical Society transactions* 33: 679-683.
- Sanchez, H., D. Kidane, M. Castillo Cozar, P.L. Graumann & J.C. Alonso, (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *Journal of bacteriology* 188: 353-360.
- Sandigursky, M., S. Sandigursky, P. Sonati, M.J. Daly & W.A. Franklin, (2004) Multiple uracil-DNA glycosylase activities in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 3: 163-169.
- Sandler, S.J. & A.J. Clark, (1994) RecOR suppression of recF mutant phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 176: 3661-3672.
- Satoh, K., H. Ohba, H. Sghaier & I. Narumi, (2006) Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 152: 3217-3226.
- Saunders, C.W. & W.R. Guild, (1981) Pathway of plasmid transformation in *Pneumococcus*: open circular and linear molecules are active. *Journal of bacteriology* 146: 517-526.
- Saveson, C.J. & S.T. Lovett, (1997) Enhanced deletion formation by aberrant DNA replication in *Escherichia coli*. *Genetics* 146: 457-470.
- Seigneur, M., V. Bidnenko, S.D. Ehrlich & B. Michel, (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95: 419-430.
- Selvam, K., J.R. Duncan, M. Tanaka & J.R. Battista, (2013) DdrA, DdrD, and PprA: components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS one* 8: e69007.

- Shah, R., R. Cosstick & S.C. West, (1997) The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *The EMBO journal* 16: 1464-1472.
- Shan, Q., J.M. Bork, B.L. Webb, R.B. Inman & M.M. Cox, (1997) RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *Journal of molecular biology* 265: 519-540.
- Shashidhar, R. & J.R. Bandekar, (2006) *Deinococcus mumbaiensis* sp. nov., a radiation-resistant pleomorphic bacterium isolated from Mumbai, India. *FEMS microbiology letters* 254: 275-280.
- Shashidhar, R. & J.R. Bandekar, (2009) *Deinococcus piscis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a marine fish. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59: 2714-2717.
- Slade, D., A.B. Lindner, G. Paul & M. Radman, (2009) Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136: 1044-1055.
- Slade, D. & M. Radman, (2011) Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 133-191.
- Smeets, L.C., S.C. Becker, G.J. Barcak, C.M. Vandenbroucke-Grauls, W. Bitter & N. Goosen, (2006) Functional characterization of the competence protein DprA/Smf in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 263: 223-228.
- Smeets, L.C., J.J. Bijlsma, E.J. Kuipers, C.M. Vandenbroucke-Grauls & J.G. Kusters, (2000) The dprA gene is required for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *FEMS immunology and medical microbiology* 27: 99-102.
- Smits, W.K., C.C. Eschevins, K.A. Susanna, S. Bron, O.P. Kuipers & L.W. Hamoen, (2005) Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. *Molecular microbiology* 56: 604-614.
- Sommer, S., F. Boudsocq, R. Devoret & A. Bailone, (1998) Specific RecA amino acid changes affect RecA-UmuD'C interaction. *Molecular microbiology* 28: 281-291.
- Srinivasan, S., J.J. Lee, S.Y. Lim, M.H. Joe, S.H. Im & M.K. Kim, (2015) *Deinococcus radioresistens* sp. nov., a UV and gamma radiation-resistant bacterium isolated from mountain soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 107: 539-545.
- Stasiak, A., I.R. Tsaneva, S.C. West, C.J. Benson, X. Yu & E.H. Egelman, (1994) The *Escherichia coli* RuvB branch migration protein forms double hexameric rings around DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7618-7622.
- Strunnikov, A.V., (2006) SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* 55: 135-144.
- Sugiman-Marangos, S.N., J.K. Peel, Y.M. Weiss, R. Ghirlando & M.S. Junop, (2013) Crystal structure of the DdrB/ssDNA complex from *Deinococcus radiodurans* reveals a DNA binding surface involving higher-order oligomeric states. *Nucleic acids research* 41: 9934-9944.
- Suihko, M.L., H.L. Alakomi, A. Gorbushina, I. Fortune, J. Marquardt & M. Saarela, (2007) Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Systematic and applied microbiology* 30: 494-508.
- Sun, J., P. Shen, H. Chao & B. Wu, (2009) Isolation and identification of a new radiation-resistant bacterium *Deinococcus guangriensis* sp. nov. and analysis of its radioresistant character. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 49: 918-924.

- Suresh, K., G.S. Reddy, S. Sengupta & S. Shivaji, (2004) *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54: 457-461.
- Sweet, D.M. & B.E. Moseley, (1976) The resistance of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA. *Mutat Res* 34: 175-186.
- Takata, T., T. Ando, D.A. Israel, T.M. Wassenaar & M.J. Blaser, (2005) Role of dprA in transformation of *Campylobacter jejuni*. *FEMS microbiology letters* 252: 161-168.
- Tanaka, H., D.A. Bergstrom, M.C. Yao & S.J. Tapscott, (2006) Large DNA palindromes as a common form of structural chromosome aberrations in human cancers. *Human cell* 19: 17-23.
- Tanaka, H. & M.C. Yao, (2009) Palindromic gene amplification--an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome. *Nature reviews. Cancer* 9: 216-224.
- Tanaka, M., A.M. Earl, H.A. Howell, M.J. Park, J.A. Eisen, S.N. Peterson & J.R. Battista, (2004) Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics* 168: 21-33.
- Tanaka, M., I. Narumi, T. Funayama, M. Kikuchi, H. Watanabe, T. Matsunaga, O. Nikaido & K. Yamamoto, (2005) Characterization of pathways dependent on the *uvrE*, *uvrA1*, or *uvrA2* gene product for UV resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* 187: 3693-3697.
- Tian, B., Y. Wu, D. Sheng, Z. Zheng, G. Gao & Y. Hua, (2004) Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence* 19: 78-84.
- Tian, B., Z. Xu, Z. Sun, J. Lin & Y. Hua, (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et biophysica acta* 1770: 902-911.
- Tirgari, M. & B.E. Moseley, (1980) Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurement of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *Journal of general microbiology*: 287-296.
- Tomasz, A., (1966) Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* cultures. *Journal of bacteriology* 91: 1050-1061.
- Tomb, J.F., G.J. Barcak, M.S. Chandler, R.J. Redfield & H.O. Smith, (1989) Transposon mutagenesis, characterization, and cloning of transformation genes of *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of bacteriology* 171: 3796-3802.
- Ton-Hoang, B., C. Pasternak, P. Siguier, C. Guynet, A.B. Hickman, F. Dyda, S. Sommer & M. Chandler, (2010) Single-stranded DNA transposition is coupled to host replication. *Cell* 142: 398-408.
- Toueille, M., B. Mirabella, P. Guerin, C. Bouthier de la Tour, S. Boisnard, H.H. Nguyen, L. Blanchard, P. Servant, A. de Groot, S. Sommer & J. Armengaud, (2012) A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J Proteomics* 75: 2588-2600.
- Tretter, L. & V. Adam-Vizi, (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 2335-2345.
- Tsuji, S., (1997) Molecular genetics of triplet repeats: unstable expansion of triplet repeats as a new mechanism for neurodegenerative diseases. *Internal medicine* 36: 3-8.
- Umez, K., N.W. Chi & R.D. Kolodner, (1993) Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3875-3879.
- Umezu, K. & R.D. Kolodner, (1994) Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* 269: 30005-30013.
- Vincent, S.D., A.A. Mahdi & R.G. Lloyd, (1996) The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. *Journal of molecular biology* 264: 713-721.
- von Sonntag, C., (2006) Free-radical-induced DNA damage and its repair. In: Springer-Verlag (ed). Berlin/Heidelberg, pp.
- Vujcic-Zagar, A., R. Dulermo, M. Le Gorrec, F. Vannier, P. Servant, S. Sommer, A. de Groot & L. Serre, (2009) Crystal structure of the IrrE protein, a central regulator of DNA damage repair in deinococcaceae. *Journal of molecular biology* 386: 704-716.
- Vukovic-Nagy, B., B.W. Fox & M. Fox, (1974) The release of a deoxyribonucleic acid fragment after x-irradiation of *Micrococcus radiodurans*. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 25: 329-337.
- Wang, L., G. Xu, H. Chen, Y. Zhao, N. Xu, B. Tian & Y. Hua, (2008) DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* 67: 1211-1222.
- Wang, P. & H.E. Schellhorn, (1995) Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Canadian journal of microbiology* 41: 170-176.
- Wang, W., J. Mao, Z. Zhang, Q. Tang, Y. Xie, J. Zhu, L. Zhang, Z. Liu, Y. Shi & M. Goodfellow, (2010) *Deinococcus wulumuqiensis* sp. nov., and *Deinococcus xibeiensis* sp. nov., isolated from radiation-polluted soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60: 2006-2010.
- Wang, Y., Q. Xu, H. Lu, L. Lin, L. Wang, H. Xu, X. Cui, H. Zhang, T. Li & Y. Hua, (2015) Protease activity of PprI facilitates DNA damage response: Mn²⁺-dependence and substrate sequence-specificity of the proteolytic reaction. *PLoS one* 10: e0122071.
- Waters, C.A., N.T. Strande, D.W. Wyatt, J.M. Pryor & D.A. Ramsden, (2014) Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair (Amst)* 17: 39-51.
- Webb, B.L., M.M. Cox & R.B. Inman, (1997) Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. *Cell* 91: 347-356.
- Wen, Y., E. Behiels & B. Devreese, (2014) Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and disease* 70: 240-249.
- Weng, L., A. Piotrowski & D.A. Morrison, (2013) Exit from competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* is regulated at multiple levels. *PLoS one* 8: e64197.
- West, S.C., (1996) The RuvABC proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 178: 1237-1241.
- Whitby, M.C., E.L. Bolt, S.N. Chan & R.G. Lloyd, (1996) Interactions between RuvA and RuvC at Holliday junctions: inhibition of junction cleavage and formation of a RuvA-RuvC-DNA complex. *Journal of molecular biology* 264: 878-890.
- White, O., J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, E.K. Hickey, J.D. Peterson, R.J. Dodson, D.H. Haft, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.L. Richardson, K.S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J.J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K.S. Makarova, L. Aravind, M.J. Daly, C.M. Fraser & et al., (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286: 1571-1577.

- Wigley, D.B., (2013) Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nature reviews. Microbiology* 11: 9-13.
- Wong-Ekkabut, J., Z. Xu, W. Triampo, I.M. Tang, D.P. Tieleman & L. Monticelli, (2007) Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical journal* 93: 4225-4236.
- Wydau, S., R. Dervyn, J. Anba, S. Dusko Ehrlich & E. Maguin, (2006) Conservation of key elements of natural competence in *Lactococcus lactis* ssp. *FEMS microbiology letters* 257: 32-42.
- Xu, G., H. Lu, L. Wang, H. Chen, Z. Xu, Y. Hu, B. Tian & Y. Hua, (2010) DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 9: 805-812.
- Xu, W., J. Shen, C.A. Dunn, S. Desai & M.J. Bessman, (2001) The Nudix hydrolases of *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* 39: 286-290.
- Xu, Z., B. Tian, Z. Sun, J. Lin & Y. Hua, (2007) Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 153: 1642-1652.
- Yadav, T., B. Carrasco, J. Hejna, Y. Suzuki, K. Takeyasu & J.C. Alonso, (2013) *Bacillus subtilis* DprA recruits RecA onto single-stranded DNA and mediates annealing of complementary strands coated by SsbB and SsbA. *J Biol Chem* 288: 22437-22450.
- Yadav, T., B. Carrasco, A.R. Myers, N.P. George, J.L. Keck & J.C. Alonso, (2012) Genetic recombination in *Bacillus subtilis*: a division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucleic acids research* 40: 5546-5559.
- Yang, Y., T. Itoh, S. Yokobori, S. Itahashi, H. Shimada, K. Satoh, H. Ohba, I. Narumi & A. Yamagishi, (2009) *Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59: 1862-1866.
- Yang, Y., T. Itoh, S. Yokobori, H. Shimada, S. Itahashi, K. Satoh, H. Ohba, I. Narumi & A. Yamagishi, (2010) *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60: 776-779.
- Yeeles, J.T. & M.S. Dillingham, (2010) The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes. *DNA Repair (Amst)* 9: 276-285.
- Yonemasu, R., S.J. McCreedy, J.M. Murray, F. Osman, M. Takao, K. Yamamoto, A.R. Lehmann & A. Yasui, (1997) Characterization of the alternative excision repair pathway of UV-damaged DNA in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research* 25: 1553-1558.
- Yoo, S.H., H.Y. Weon, S.J. Kim, Y.S. Kim, B.Y. Kim & S.W. Kwon, (2010) *Deinococcus aerolatus* sp. nov. and *Deinococcus aerophilus* sp. nov., isolated from air samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60: 1191-1195.
- Yuan, M., W. Zhang, S. Dai, J. Wu, Y. Wang, T. Tao, M. Chen & M. Lin, (2009) *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59: 1513-1517.
- Zahra, R., J.K. Blackwood, J. Sales & D.R. Leach, (2007) Proofreading and secondary structure processing determine the orientation dependence of CAG x CTG trinucleotide repeat instability in *Escherichia coli*. *Genetics* 176: 27-41.
- Zahradka, K., D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbek, M. Petranovic, A.B. Lindner & M. Radman, (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443: 569-573.

Zimmerman, J.M. & J.R. Battista, (2005) A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the Deinococcaceae. *BMC Microbiol* 5: 17.

Annexes

DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium

Alice Devigne,[†] Solenne Ithurbide,[†]
Claire Bouthier de la Tour, Fanny Passot,
Martine Mathieu, Suzanne Sommer and
Pascale Servant*

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA,
CNRS, Université Paris Sud, Bâtiment 409, 91405
Orsay, France.

Summary

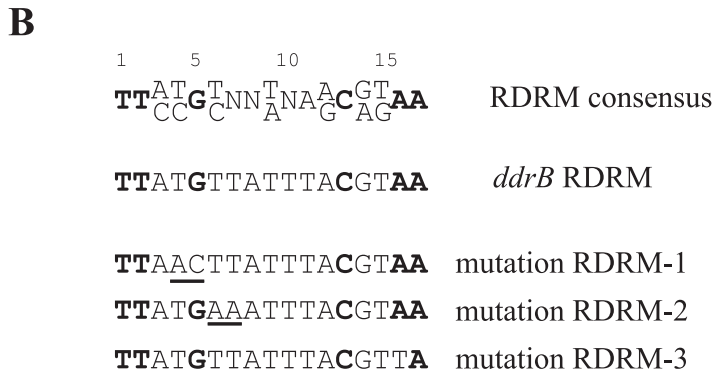
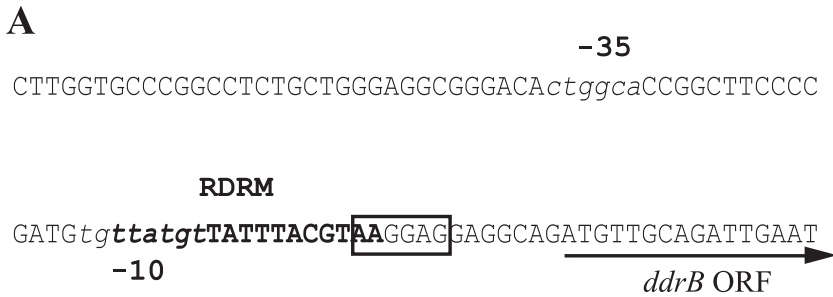
Deinococcus radiodurans is known for its extreme radioresistance. Comparative genomics identified a radiation-desiccation response (RDR) regulon comprising genes that are highly induced after DNA damage and containing a conserved motif (RDRM) upstream of their coding region. We demonstrated that the RDRM sequence is involved in *cis*-regulation of the RDR gene *ddrB* *in vivo*. Using a transposon mutagenesis approach, we showed that, in addition to *ddrO* encoding a predicted RDR repressor and *irrE* encoding a positive regulator recently shown to cleave DdrO in *Deinococcus deserti*, two genes encoding α -keto-glutarate dehydrogenase subunits are involved in *ddrB* regulation. In wild-type cells, the DdrO cell concentration decreased transiently in an IrrE-dependent manner at early times after irradiation. Using a conditional gene inactivation system, we showed that DdrO depletion enhanced expression of three RDR proteins, consistent with the hypothesis that DdrO acts as a repressor of the RDR regulon. DdrO-depleted cells loose viability and showed morphological changes evocative of an apoptotic-like response, including membrane blebbing, defects in cell division and DNA fragmentation. We propose that DNA repair and apoptotic-like death might be two responses mediated by the same regulators, IrrE and DdrO, but differently activated depending on the persistence of IrrE-dependent DdrO cleavage.

Introduction

Deinococcus radiodurans has outstanding resistance to ionizing radiation and, more generally, to DNA damaging agent treatments. This bacterium is able to reconstitute a functional genome within a few hours from a myriad of radiation-induced chromosomal fragments. This exceptional radioresistance results from the combination of multiple strategies, including an efficient DNA double-strand break repair, a protection of proteins against oxidation and a compact structure of the nucleoid acting together to ensure cell survival after exposure to huge doses of gamma-rays (for review, see Blasius *et al.*, 2008; Daly, 2009; Slade and Radman, 2011). Global analysis of gene expression allowed the identification of a series of genes induced after irradiation or desiccation (Tanaka *et al.*, 2004). Among these, there are genes encoding proteins involved in DNA repair (*recA*, *recQ*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*), in adaptation to oxidative stress (*kata*, *terB*, *terZ*, *mrsA*), in DNA supercoiling (*gyrA* and *gyrB*) and several *Deinococcus* genus-specific genes (*ddrA*, *ddrB*, *pprA* . . .). All of these genes are induced as part of a coordinately regulated response to DNA damage.

Complex regulatory networks are required for adaptation of cellular metabolism to environmental changes and to survive under stress. In *Escherichia coli*, DNA-damaging treatments result in SOS induction, a cellular process mediated by the RecA-dependent cleavage of LexA, the repressor of the SOS genes. *D. radiodurans* possesses two LexA homologs (LexA1 and LexA2) that undergo, as in *E. coli*, a RecA-dependent cleavage after DNA damage. However, *recA* induction following γ -irradiation is not controlled by LexA1 or LexA2 (Narumi *et al.*, 2001; Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2006), but depends on the *Deinococcus* specific regulatory protein IrrE, also called PprI, that was shown to be a positive effector that enhances the expression of some DNA repair genes following exposure to radiation (Earl *et al.*, 2002a; Hua *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2009). Cells devoid of IrrE exhibit a dramatic decrease in resistance to ionizing radiation (Earl *et al.*, 2002a; Hua *et al.*, 2003). Crystallographic data, combined with a site-directed mutagenesis analysis on the *Deinococcus deserti* IrrE

Accepted 2 March, 2015. *For correspondence. E-mail pascale.servant@igmors.u-psud.fr; Tel. 33 1 69 15 58 17; Fax 33 1 69 15 78 08. [†]Co-first authors.



protein, suggest that IrrE possesses a putative proteolytic activity essential for radiotolerance (Vujicic-Zagar *et al.*, 2009).

A common radiation/desiccation response motif (RDRM), a 17 bp palindromic sequence, was found in the upstream region of *recA*, *ddrB*, *pprA*, *gyrA* and other highly radiation-induced genes in *D. radiodurans* and of their homologs in *Deinococcus geothermalis* and *D. deserti*, defining the radiation desiccation response (RDR) regulon. This suggests that a transcription regulator could target this common RDRM sequence (Makarova *et al.*, 2007; de Groot *et al.*, 2009). It was shown that the *D. deserti* IrrE regulator does not bind to DNA containing the RDRM sequence (Vujicic-Zagar *et al.*, 2009). DdrO, another *Deinococcaceae*-specific protein whose expression is induced after gamma irradiation (Tanaka *et al.*, 2004), was proposed to be a global regulator of the *Deinococcus* response to radiation (Makarova *et al.*, 2007). Moreover, it was recently shown that the *D. deserti* IrrE protein cleaves DdrO *in vitro* and when the two proteins are co-expressed in *E. coli* (Ludanyi *et al.*, 2014). IrrE-dependent cleavage of DdrO was also observed *in vivo* after exposure to radiation of *D. deserti* bacteria (Ludanyi *et al.*, 2014). In *E. coli*, the *D. deserti* DdrO protein can repress a promoter containing an RDRM sequence (Ludanyi *et al.*, 2014). However, the regulatory mechanisms underlying the response to radiation in the *Deinococcaceae* are still poorly characterized.

In this study, we aimed to identify the factors involved in the regulation of the RDR regulon by screening an insertion mutant library for the impaired regulation of a *lacZ*

reporter gene fused to the RDRM containing promoter region of the *ddrB* gene. The *ddrB* gene is among those whose expression is highly up-regulated following irradiation (Tanaka *et al.*, 2004). It encodes a protein that binds to single-stranded DNA (Norais *et al.*, 2009) and participates in the early stages of DNA repair when cells are exposed to high radiation doses (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). We showed that the expression of *ddrB* is affected by insertions located upstream of *irrE*, in *ddrO*, and in genes encoding α -keto-glutarate dehydrogenase (KGDH) subunits. We also report that depletion of DdrO leads to high expression of DdrB, GyrA and PprA proteins, consistent with the hypothesis that DdrO acts as a repressor of the RDR regulon. DdrO-depleted cells lose viability and show morphological changes evocative of an apoptotic-like response. We propose that DNA repair and apoptotic-like death (ALD) might be two responses mediated by the same regulators, IrrE and DdrO, but differently activated depending on the persistence of IrrE-dependent DdrO cleavage.

Results

The RDRM sequence is involved in the regulation of ddrB expression

Putative cis-acting regulatory elements in the *ddrB* promoter region are shown in Fig. 1. These include: (i) -35 and -10 sequences predicted by Softberry (Solovyev and Salamov, 2011), (ii) a ribosome binding site (AAGGAG)

Fig. 1. Sequence of the *ddrB* promoter region.

A. Nucleotide sequence of the putative promoter region of *ddrB*. The region encoding *ddrB* is underlined. A putative Shine Dalgarno sequence is boxed, the RDRM sequence is indicated in bold letters. The -10 and -35 like sequences are in lowercase letters and italicized.

B. The mutagenized bases in RDRM sequence in different constructs are underlined. The conserved nucleotides are in bold.

located at an optimal distance from the initiation codon of the *ddrB* open reading frame (re-annotated sequence; Norais *et al.*, 2009) and (iii) a 17 bp palindromic RDRM sequence overlapping the -10 sequence and part of the ribosome binding site (Fig. 1A).

In order to determine if the RDRM sequence plays a key role in the regulation of *ddrB* expression, we introduced mutational changes at various positions in the RDRM sequence (Fig. 1B). Site-directed mutagenesis was performed on a translational *ddrB::lacZ* fusion to facilitate the functional analysis of the mutants. The *ddrB::lacZ* allele and its upstream wild-type or mutated RDRM sequence were integrated in the *D. radiodurans* genome in replacement of the *crtI* (DR_0861) gene to facilitate a white/blue screening of mutants with altered *ddrB::lacZ* expression on TGY-XGal plates. Indeed, $\Delta crtI$ cells lack the Deinococcal red pigment deinoxanthin and form colourless, instead of pink, colonies on TGY plates.

The functionality of the wild-type *ddrB::lacZ* fusion was assessed by testing its induction after mitomycin C (MMC) treatment (Fig. 2A) or γ -irradiation (Fig. S1). In the presence of MMC, induction rapidly occurred and continued for at least 2 h (Fig. 2A). The same pattern of induction was observed in γ -irradiated cells (Fig. S1). In contrast, in the absence of inducing treatments, the β -galactosidase activity was constant and at a low level, irrespective of the incubation time (data not shown).

Mutations in the RDRM sequence strongly influenced the expression of the *ddrB::lacZ* fusion. The fusion became constitutively expressed in mutants RDRM-1 and RDRM-2 (Fig. 2A). The level of β -galactosidase in these mutants represented a 100-fold increase over the basal wild-type level, and a 10-fold increase over the wild-type induced level (at 2 h after addition of MMC) (Fig. 2A). These results suggest that the RDRM sequence represents the binding site of a repressor protein. The RDRM-1 and RDRM-2 mutated sites may be poorly recognized by the repressor, resulting in constitutive high-level expression of *ddrB*. A large increase in the basal level of *ddrB::lacZ* expression was also observed in mutant RDRM-3, but the mutant was still inducible (Fig. 2A). The RDRM-3 mutation could enhance the DdrB translation efficiency by changing the ribosome-binding site. From these results, we conclude that the RDRM sequence plays a key *cis*-regulatory role on the expression of *ddrB*.

Genetic screening for regulator(s) of *ddrB* expression

In order to identify genes regulating *ddrB* expression, we used a mini-*Tn5* delivery system (Dulermo *et al.*, 2015) to obtain a library of random stable insertions in the translational *ddrB::lacZ* fusion reporter strain. The library was plated on TGY-XGal plates to screen mutants with altered basal and/or induced level of *ddrB* expression. As the

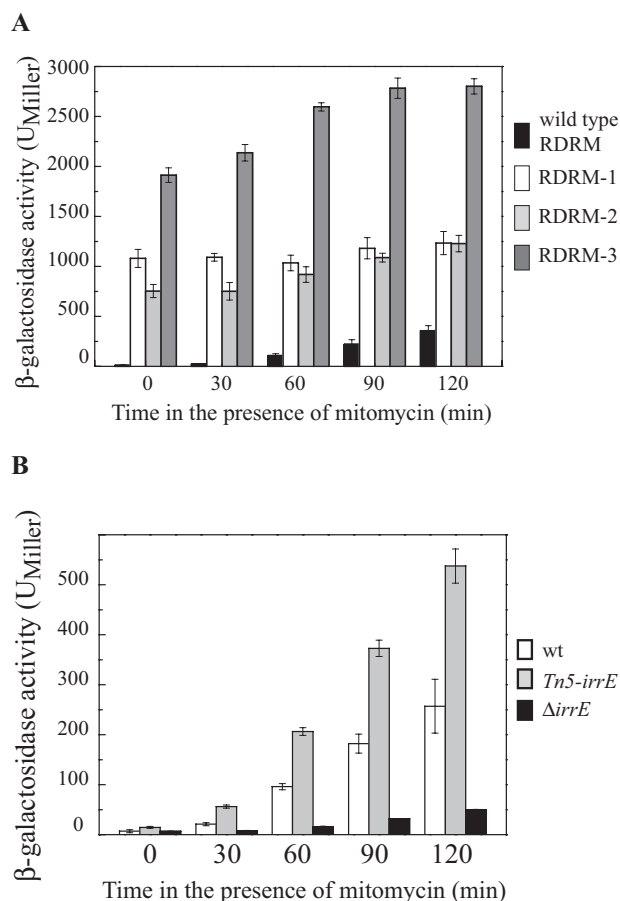


Fig. 2. Expression of translational *ddrB::lacZ* reporter gene fusion after treatment with mitomycin. *D. radiodurans* cells exposed to mitomycin C (600 ng ml⁻¹) were incubated for the indicated time periods and β -galactosidase activity was measured as described in Experimental procedures. The results are the average of at least three independent experiments.

A. Expression of translational *ddrB::lacZ* reporter gene fusion containing a mutation in the RDRM sequence. GY15512 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$] (black bars), GY15576 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$, RDRM-1 mutation] (white bars), GY15577 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$, RDRM-2 mutation] (light grey bars), GY15579 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$, RDRM-3 mutation] (grey bars). B. Effects of $\Delta irrE$ and *Tn5-irrE* on the expression of the reporter gene *ddrB::lacZ* fusion. GY15512 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$] (white bars), GY15515 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat) \Delta irrE\Omega hph$] (black bars), GY15580 [$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat) Tn5-irrE$] (grey bars).

reporter strain gave rise to colourless colonies on TGY-XGal plates or pale blue colonies on TGY-XGal plates with MMC, mutants with increased β -galactosidase expression can be easily scored as blue colonies. Over 15 000 random transposon mutants were screened on TGY-Xgal plates (with or without MMC) and 42 blue colonies were selected. The phenotypes conferred by the insertions were confirmed after transformation of the *ddrB::lacZ* bacteria (GY15512 strain) with genomic DNA from the insertion mutants (Fig. S2). The position of mini-Tn5 insertions

Table 1. Genes identified by screening of a mini-Tn5 library for mutants affected in the regulation of *ddrB::lacZ* translational fusion.

Category	Gene	Number of isolated clones on medium		Function
		Without MMC	+ MMC	
Regulators	DR_2574	2		Transcriptional regulator, DdrO IrrE, RecA regulator
	DR_0167	1		
Metabolism	DR_0083	1	3	α -keto-glutarate dehydrogenase E2 component
	DR_0287	4	8	
	DR_0612	1		Arginine utilization, RocB
	DR_0640		1	S-adenosylmethionine synthetase
	DR_2169	1		Drug transport protein
Unknown functions	DR_0686	1		Hypothetical protein
	DR_A0369		1	Hypothetical protein, plasmid replication initiator protein
	DR_B0142	2		Hypothetical protein

was determined by arbitrary polymerase chain reaction (AP-PCR) and DNA sequencing (Table 1 and Table S1).

In 16 clones, the mini-*Tn5* insertion sites were clustered in a restricted region upstream of the reporter fusion (Table S1). We propose that a read-through from the promoter of the hygromycin cassette carried by the transposon might enhance *ddrB::lacZ* expression in these mutants. Twenty-six insertions were located in 10 different genes (Table 1 and Table S1). Most of the insertions influencing the outcome of *ddrB::lacZ* expression affected genes involved in metabolism (Table 1). In particular, 16 insertions were found in genes encoding the E1 or E2 component of α -KGDH. Four other insertions were in genes of unknown function. Interestingly, two insertions were in potential regulators of *ddrB* expression, one within *ddrO* and the other 40 nucleotides upstream of the coding region of the *irrE* gene [taking into account the reannotation of *irrE* proposed by Ludanyi *et al.* (2014), Table 1]. To verify that the phenotype of the insertion mutants resulted from an altered DNA damage response and not from effects on *lacZ* expression, we determined whether they also affected expression of PprA protein by Western blot analysis (Fig. 3 and Fig. S3). We found that the insertions disrupting the coding region of KGDH subunits E1 or E2 and *ddrO* markedly increased the basal and induced expression levels of PprA, and, thus, appear as *bona fide* mutants affecting the DNA damage

response. The insertion of the miniTn5 upstream of *irrE* also moderately increased PprA expression (Fig. 3). In contrast, insertions in the other genes identified in our initial screening did not affect the expression of the PprA protein (Fig. S3). How the two regulators, DdrO and IrrE, influence *ddrB* and *pprA* expression was further analysed.

IrrE is a positive regulator of DdrB

The IrrE protein is thought to provide a global switch in cells recovering from DNA damage, by up-regulating the expression of several proteins (Lu *et al.*, 2009). We verified that the absence of IrrE in the $\Delta irrE$ strain strongly decreased induction of *ddrB::lacZ* expression after exposure to MMC (Fig. 2B). In contrast, insertion of mini-*Tn5* upstream *irrE* increased induction of *ddrB::lacZ* by MMC, as the β -galactosidase activity at each time point in the mutant was twofold higher than in the wild type (Fig. 2B). In addition, the insertion mutant showed a wild-type resistance level to MMC, while the $\Delta irrE$ mutant was MMC sensitive (data not shown). The phenotype of the insertion mutant might be due to enhanced expression of the IrrE positive regulator driven by the *hph* promoter carried by the mini-*Tn5* transposon, and this mutant may moderately enhance the level of expression of genes of the RDR regulon.

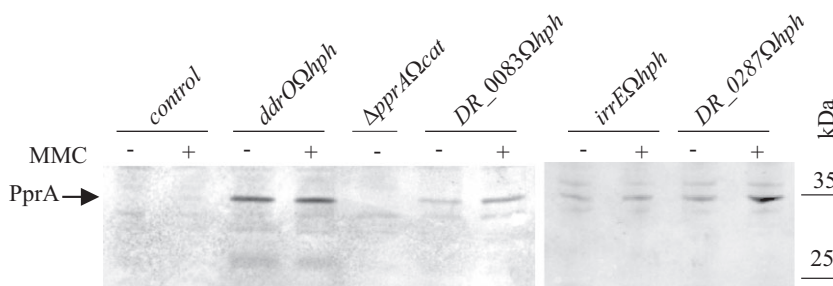


Fig. 3. Expression of PprA in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates. Bacteria were grown on TGY plates with hygromycin in the presence (80 ng ml⁻¹) or absence of MMC for 3 days. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blot with anti-PprA antibodies. Five micrograms of protein were loaded on each well. Control: a mini-Tn5 insertion mutant non-deregulated for *ddrB* expression.

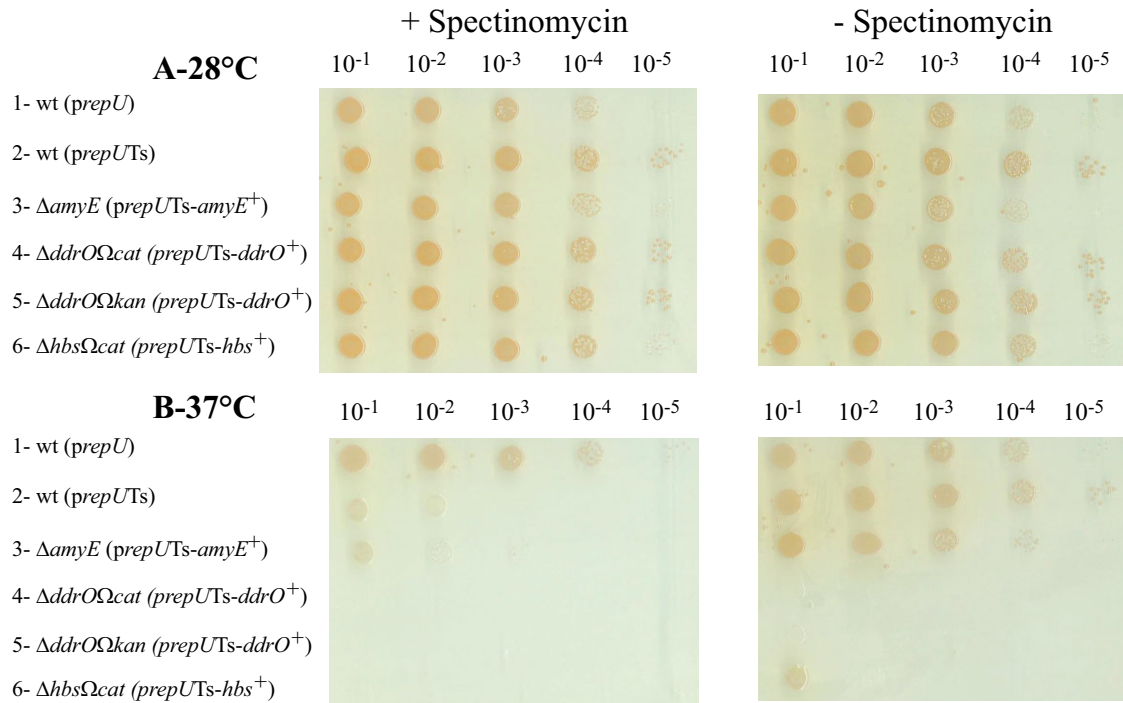


Fig. 4. *ddrO* is essential for *D. radiodurans* viability. Strains were grown in liquid medium with spectinomycin at 28°C. Sequential dilutions of cells were spotted on TGY plates in the presence or absence of spectinomycin at 28°C (A) or 37°C (B). Lane 1: strain GY13785 containing non-thermosensitive plasmid p11554 (*prepU*); lane 2: strain GY13747 containing thermosensitive plasmid p13841 (*prepUTs*); lane 3: strain GY13771 [$\Delta amyE$ (*prepUTs-amyE*⁺)]; lane 4: strain GY14164 [$\Delta ddrO$ (*prepUTs-ddrO*⁺)]; lane 5: strain GY14165 [$\Delta ddrO$ (*prepUTs-ddrO*⁺)]; lane 6: strain GY13795 [Δhbs (*prepUTs-hbs*⁺)].

DdrO is an essential protein

To analyze the role of the *DdrO* protein in the regulation of *ddrB*, we decided to construct a deletion mutant by replacing the entire *ddrO* coding region with a kanamycin resistance (Kan^R) cassette. As previously observed in *D. deserti* (Ludanyi *et al.*, 2014), attempts to obtain homogenotes containing the $\Delta ddrO\Omega kan$ allele on each of the multiple genomic copies present in *D. radiodurans* were unsuccessful, even after extensive purification on selective plates (Fig. S4). Likewise, the two mutants isolated from the DNA transposition library were heterogenotes (Fig. S4B). These results and those of Ludanyi *et al.* (2014) can only suggest that the *D. radiodurans* and the *D. deserti* *DdrO* proteins are essential for cell viability.

To confirm that the *D. radiodurans ddrO* is an essential gene, we used a conditional gene inactivation system (Nguyen *et al.*, 2009). *D. radiodurans* was transformed by a temperature-sensitive replication vector containing the coding region of the *ddrO* gene, giving rise to a merodiploid that contains chromosomal and plasmid copies of *ddrO*. Each chromosomal copy of the wild-type *ddrO* allele was then successfully replaced with its $\Delta ddrO\Omega kan$ counterpart, owing to the presence of the complementing plasmid (Fig. S4D). We then tested the viability of the cells after the loss of the plasmid at the non-permissive tem-

perature. We used, as controls, similar constructs encoding the essential HU protein (Nguyen *et al.*, 2009) and the AmyE protein, previously shown to be dispensable for cell viability (Meima *et al.*, 2001). Contrary to $\Delta amyE$ (*prepUTs-amyE*⁺) bacteria that grew normally at 30°C and 37°C (Fig. 4, lanes 3), the $\Delta ddrO$ (*prepUTs-ddrO*⁺) bacteria (Fig. 4A and B, lanes 4–5) and the Δhbs (*prepUTs-hbs*⁺) (Fig. 4, lanes 6) grew normally at the permissive temperature (30°C) but did not grow at the non-permissive (37°C) temperature, demonstrating the essentiality of the *ddrO* gene in *D. radiodurans*.

DdrO behaves as a transcriptional repressor of *ddrB* expression

To determine whether regulation of *ddrB* expression by the *DdrO* protein was at the transcriptional level, a transcriptional and a translational fusion were integrated at the *crtI* locus of the tester strain $\Delta ddrO$ (*prepUTs-ddrO*⁺). As a control, a fusion of *lacZ* to the promoter of *DR_1652* (encoding the TnpA transposase of *ISDra2*), which is not part of the RDR regulon, was introduced into the tester strain. As can be seen in Fig. 5, depletion of *DdrO* in cells grown at 37°C resulted in the induction of the reporter gene from both transcriptional and translational fusions,

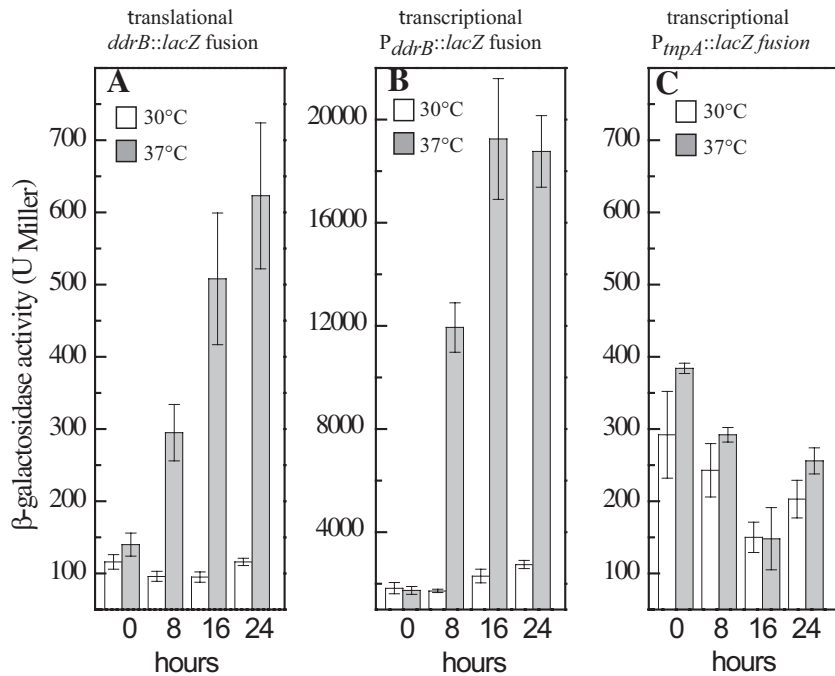


Fig. 5. Effect of DdrO depletion on expression of translational and transcriptional *ddrB::lacZ* reporter fusions. Cells in exponential growth cultivated at 30°C in media supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C (white bars) or 37°C (grey bars). β -galactosidase activity was measured as described in the Experimental procedures. The results are the average of at least three independent experiments.
 A. GY16476 [$\Delta crtI\Omega$ (*ddrB::lacZ* Ω cat translational fusion) $\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (*prepUTs::ddrO*)].
 B. GY16474 [$\Delta crtI\Omega$ ($P_{ddrB}::lacZ$ Ω cat transcriptional fusion) $\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (*prepUTs::ddrO*)].
 C. GY16480 [Δ (*ISDra2F*) $\Omega tetA\Omega P_{tnpA}::lacZ$ Ω cat (transcriptional fusion) $\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (*prepUTs::ddrO*)].

with an induction factor after 24 h of approximately 10-fold for the transcriptional fusion and fourfold for the translational fusion. No induction of β -galactosidase activity was observed under the same conditions for the $P_{tnpA}::lacZ$ fusion. These results indicate that DdrO acts at the transcription level as a repressor of the *ddrB* expression.

Depletion of DdrO induces expression of DdrB, PprA and GyrA proteins

To test whether DdrO exerts a regulatory role on other genes, we analyzed the effect of DdrO depletion on the expression of the proteins encoded by *ddrB* and two other genes, *pprA* and *gyrA*, belonging to the RDR regulon (Makarova *et al.*, 2007). For this purpose, we used derivatives of the tester strain $\Delta ddrO$ (*prepUTs::ddrO*) expressing DdrB-SPA, PprA-FLAG or GyrA-SPA tagged proteins (SPA motif contains the 3X FLAG epitope). As shown in Fig. 6, depletion of DdrO in cells grown at the non-permissive temperature resulted in an increase of the cellular level of the three tagged proteins. This was particularly evident for the PprA-FLAG protein that displayed a very low basal level in cells grown at the permissive temperature (Fig. 6B). The increase was more modest for GyrA-SPA because of a higher basal level of the GyrA protein at 30°C (Fig. 6C). The regulatory action of DdrO on the expression of DNA gyrase was further assessed using a *lacZ* reporter gene fused to the *gyrA* promoter. We showed that β -galactosidase activity was increased fourfold when DdrO was depleted (Fig. S5). Taken together,

our results are consistent with a global role of DdrO as repressor of the RDR regulon in *D. radiodurans*.

The cell concentration of DdrO in irradiated cells is regulated by IrrE

The recent study by Ludanyi *et al.* (2014) showed that IrrE protein from *D. deserti* is a metalloprotease that cleaves DdrO protein *in vitro* and *in vivo* when *D. deserti* cells are exposed to ionizing radiation. To determine whether a similar mechanism also operates in *D. radiodurans*, we analysed the fate of DdrO protein in cells recovering from γ -irradiation. For this purpose, the DdrO protein was tagged at its C-terminus with the FLAG epitope and expressed in replacement of the native DdrO protein. The tagged protein was functional, as indicated by the fact that homozygous *ddrO::flag* recombinants were easily obtained (Fig. S6) and showed a wild-type growth rate (data not shown).

Western blot analysis of cells exposed to 3.8 kGy γ -irradiation showed that cellular levels of DdrO-FLAG protein quickly decreased at early times after irradiation. During post-irradiation incubation, the cell concentration of DdrO-FLAG continued to decrease to reach a minimum at 15 min (Fig. 7A). Two hours after exposure to irradiation, the amount of DdrO-FLAG began to increase to reach the same level at 5 h as that observed in non-irradiated cells. In contrast, the level of DdrO protein remained constant in an irradiated or non-irradiated $\Delta irrE$ mutant (Fig. 7B). These results are in agreement with

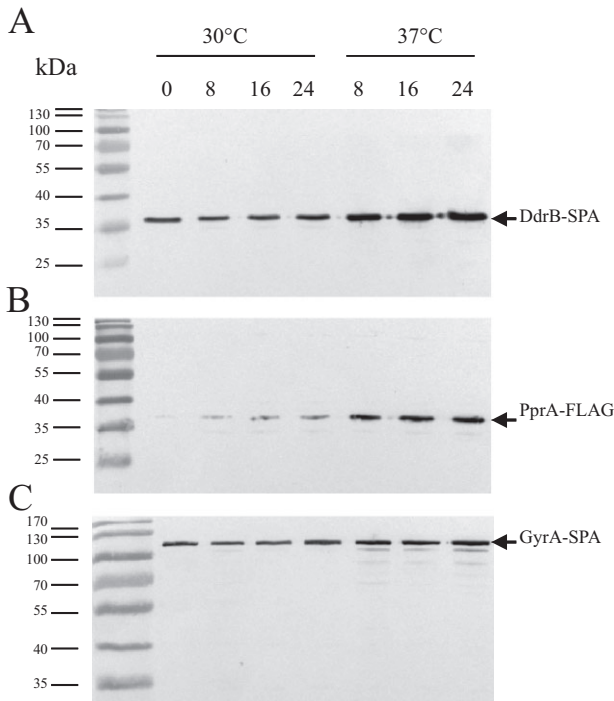


Fig. 6. Effect of DdrO depletion on the cell concentration of DdrB, PprA and GyrA. Bacteria cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin to $A_{650nm} = 0.3$ were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C or at 37°C during the indicated periods (hours). Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analysed by Western blot with anti-FLAG antibodies. Five micrograms of protein were loaded on each well.

A. *D. radiodurans* GY15574 [*ddrB::spaΩcat ΔddrOΩkan/p11891* (*prepUTs::ddrO*)].
 B. GY 15570 [*pprA::flagΩcat ΔddrOΩkan/p11891* (*prepUTs::ddrO*)].
 C. GY15572 [*gyrA::flagΩcat ΔddrOΩkan/p11891* (*prepUTs::ddrO*)].

those obtained in *D. deserti* by Ludanyi *et al.* (2014) and suggest that DdrO is cleaved by IrrE in γ -irradiated *D. radiodurans*.

Depletion of DdrO protein generates large morphological changes

To determine the dynamics of the cellular alterations occurring during DdrO protein depletion, we analysed cell morphologies in samples taken at different times after the shift of cultures to the non-permissive temperature (Fig. 8). Wild-type cells containing the thermosensitive replication vector exhibited normal cell morphology at 28°C as well as at 37°C (Nguyen *et al.*, 2009). In $\Delta ddrO$ (*prepUTs::ddrO*⁺) bacteria, after 8 h at 37°C the cells became larger, with 3.1% (5/159) of cells being ghost cells. Moreover, 35% (56/159) of the cells showed abnormal segregation of the nucleoids (Fig. 8) with only two or three cells containing DNA per tetracoccus. We saw that 15.2% of cells showed

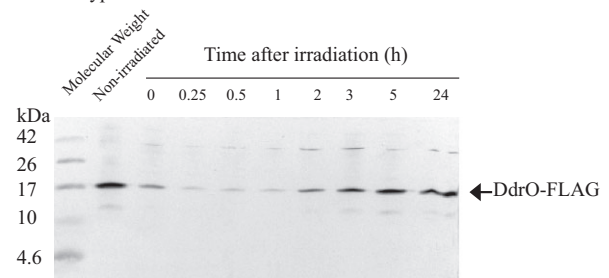
two to four highly condensed dots of DAPI staining. In all cells, the second septum required to form a tetrad is abortive or not visible.

After 16 h at 37°C, the situation was more dramatic, with 6.4% (10/156) of ghost cells and more than 90% of cells showing abnormalities in nucleoid organization with highly condensed dots of DAPI staining. After 24 h at 37°C, 7.8% of the cells were ghost cells and the DAPI staining appears diffuse throughout the cell. We also observed abnormalities in the cell membranes when cells were incubated 16 h or 24 h at 37°C, with 5.6% (9/161) and 11.8% (19/161) of cells showing multiple dots of intense membrane staining respectively. Interestingly, after 24 h at 37°C, membrane staining revealed the formation of small membrane-bound vesicles outside of cells, which is often referred to as 'blebbing' (Fig. 8). These data suggest that depletion of DdrO has a pleiotropic effect in *D. radiodurans*, probably via deregulation of the expression of genes controlled by DdrO.

Depletion of DdrO causes DNA degradation

We showed that in DdrO-depleted cells, the nucleoid organization was disturbed. Moreover, the formation of small membrane-bound vesicles outside of cells was observed. These phenotypes, along with DNA fragmenta-

A- In wild type context



B- In $\Delta irrE$ context

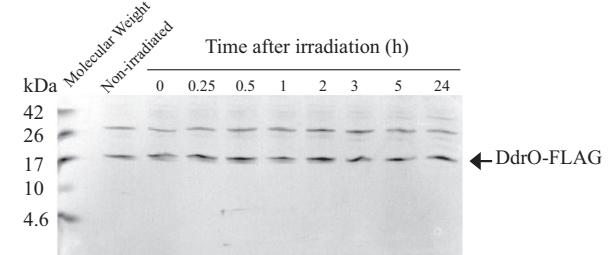


Fig. 7. Decreased DdrO cell concentration after gamma irradiation is dependent on the presence of IrrE. *D. radiodurans* cells extracts from unirradiated or irradiated cells exposed to 3.8 kGy γ -irradiation and incubated during the indicated periods (hours) were subjected to 16% SDS-PAGE and analysed by Western blotting with anti-FLAG antibodies.

A. GY16173 (*ddrO::flagΩcat*).
 B. GY16177 (*ddrO::flagΩcat ΔirrEΩkan*).

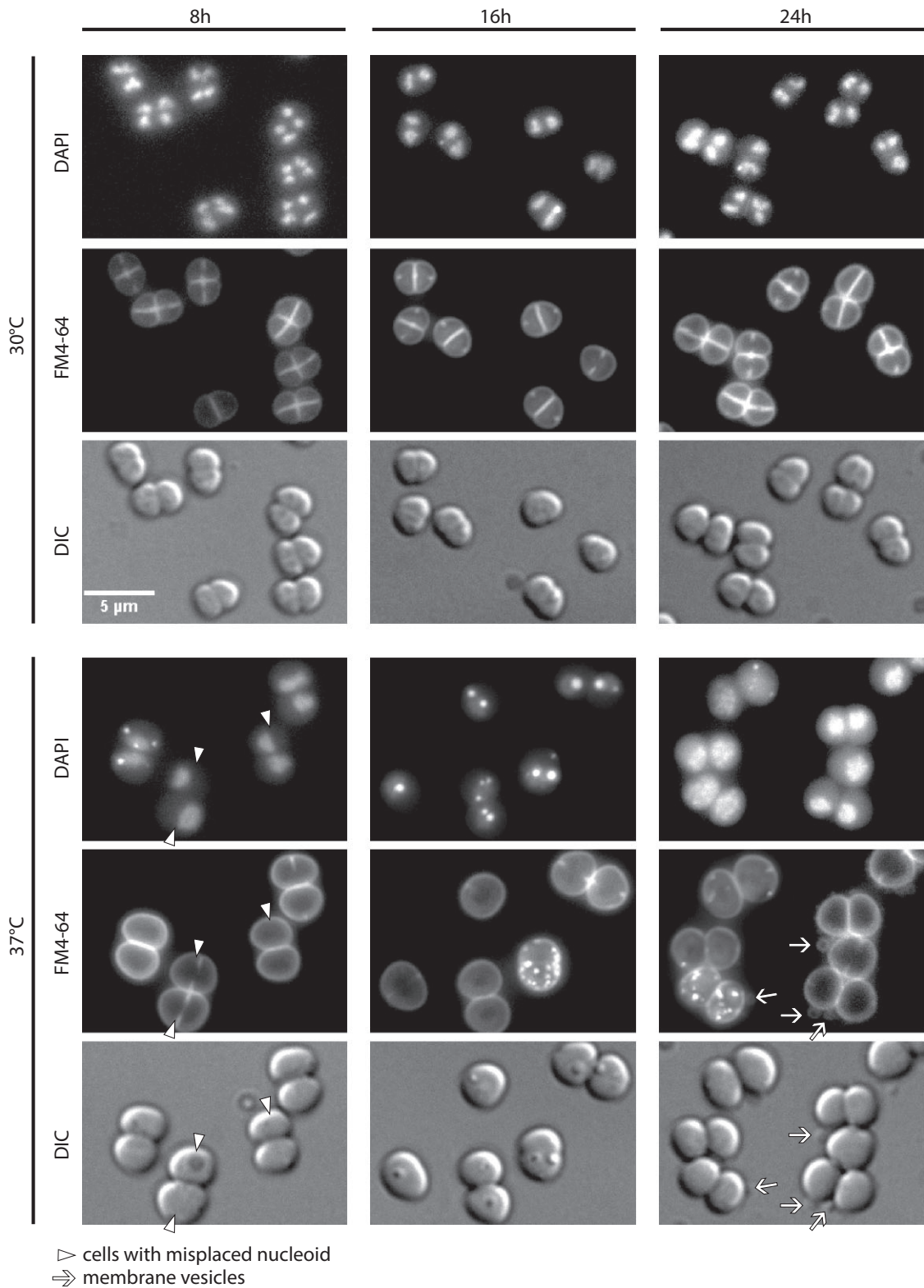


Fig. 8. Effect of *ddrO* depletion on *D. radiodurans*. Cells [GY 14165 [$\Delta ddrO\Omega kan/p11891(preUTs::ddrO^+)$]] in exponential growth phase cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C (upper part) or at 37°C (lower part). In each part, the first line contains the pictures of the DNA staining (DAPI), the second line, the pictures of membrane staining (FM4-64); and the third line, the picture of the Nomarski interference contrast (DIC). All pictures are the same scale (bar = 5 μm).

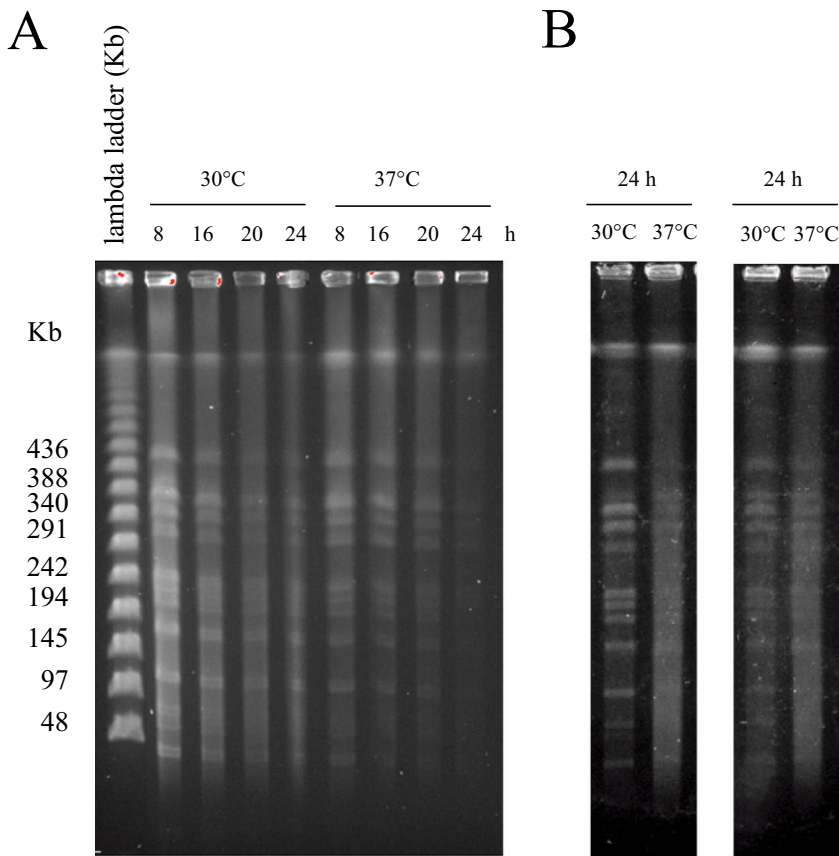


Fig. 9. DNA degradation in DdrO depleted cells. Cells {GY 14165 [$\Delta ddrO\Omega kan/p11891(prepUTs::ddrO^+)$]} in exponential growth phase cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium, and incubated at 30°C or at 37°C.

A. Aliquots were removed after 8, 16, 24 h incubation at 30°C or 37°C, and used to prepare DNA plugs for *NotI* digestion prior to being subjected to pulsed-field gel electrophoresis.

B. Two other independent experiments were performed using the same protocol; only the 24 h time points are shown.

tion, are the hallmarks of apoptotic bacterial cell (Bayles, 2014). We used pulsed-field gel electrophoresis to determine if extensive DNA fragmentation occurred during the course of DdrO depletion. We found that the majority of genomic DNA was degraded in cells incubated 24 h at the non-permissive temperature (Fig. 9). Indeed, we observed a diffuse smear of DNA with only very faint bands in the pattern of *NotI* digestion of total genomic DNA. These results are consistent with the diffuse DAPI staining observed under the same conditions by fluorescence microscopy (Fig. 8, 24 h, 37°C). Altogether, our results indicate that the DNA is degraded and an ALD might take place upon long-lasting depletion of DdrO.

Discussion

Deinococcus radiodurans DNA damage response results in enhanced expression of a large number of genes related to DNA repair, proteases, chaperones, transcription factors and various metabolic pathways (Liu *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004). *In silico* analysis of sequences flanking a set of *D. radiodurans* genes that are strongly up-regulated by ionizing radiation and desiccation identified a common 17 bp palindromic sequence, the RDRM sequence, in their

upstream region and determined a potential radiation-desiccation response (RDR) regulon in *D. radiodurans* and *D. geothermalis* (Makarova *et al.*, 2007). More recently, the RDR regulon has also been identified in *D. deserti* (de Groot *et al.*, 2009).

Here, we demonstrated, upon mutational changes in the *D. radiodurans* RDRM sequence, the key role of this *cis*-acting element in the regulation of the expression of *ddrB*, a gene highly induced after exposure to ionizing radiation or desiccation. To identify new factors involved in the regulation of the RDR regulon in *D. radiodurans*, we screened a Tn5 mutant library for insertions that enhanced expression of a *ddrB::lacZ* fusion. We showed the involvement of DdrO, IrrE, and E1 and E2 subunits of α -KGDH in the expression of DdrB and PprA proteins.

Very recently, it has been proposed that the DdrO protein acts as a specific repressor of the RDR regulon in *D. deserti* (Ludanyi *et al.*, 2014). We found that depletion of DdrO in *D. radiodurans* resulted in increased cellular levels of three proteins encoded by the RDR regulon: the DdrB, PprA and GyrA proteins (Fig. 6). These results strongly support the predicted role of DdrO as repressor of the RDR regulon. In *D. radiodurans* wild-type cells, the level of DdrO quickly decreased during the first 2 h of

post-irradiation incubation and then increased to reach the level found in non-irradiated cells at 5 h. No such changes were observed in a $\Delta irrE$ mutant (Fig. 7). These results suggest that, like in *D. deserti*, DdrO undergoes an IrrE-dependent proteolytic cleavage in *D. radiodurans* cells after irradiation (Ludanyi *et al.*, 2014). In *D. deserti*, the DdrO cleavage occurs between residues L106 and R107, and these residues (L108 and R109) are conserved in *D. radiodurans* DdrO. In *D. deserti*, and probably in *D. radiodurans*, the DdrO cleavage removes the highly conserved 23 C-terminal residues and is expected to inactivate the DdrO protein, probably by inhibiting the formation of DdrO dimers (Ludanyi *et al.*, 2014). Furthermore, the *ddrO* gene itself is part of the RDR regulon and is among the highest up-regulated genes in *D. radiodurans* cells recovering from exposure to γ -radiation (Tanaka *et al.*, 2004). Other regulators of stress responses, such as the *E. coli* LexA repressor of the SOS genes, are part of the regulon they control (for reviews, see Erill *et al.*, 2007; Kreuzer, 2013; Baharoglu and Mazel, 2014). It is interesting to note that the re-emergence of DdrO in wild-type cells, at 2 h after exposure to radiation, appears to coincide with the completion of the assembly of chromosomal fragments in cells exposed to the same irradiation dose (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). The period of DdrO decrease corresponds to the induction of the RDR regulon, as determined by the kinetics of transcriptome changes following irradiation (Tanaka *et al.*, 2004).

The bacterial SOS response is a paradigm of global regulatory networks targeted at DNA damage (for recent reviews, see Kreuzer, 2013; Baharoglu and Mazel, 2014). While SOS induction in *E. coli* is triggered by the presence of RecA nucleofilaments on single-stranded DNA, the signal and the signal transduction sensors that initiate the RDR response in *D. radiodurans* are not currently known. The *D. radiodurans irrE* gene is constitutively expressed (Gao *et al.*, 2006), suggesting that the IrrE protease must be activated to exert its regulatory function after DNA damage. Our results suggest that an increase in the level of the native IrrE protease is sufficient to moderately enhance the expression of RDR genes (Figs 2B and 3). These results are in agreement with those showing that, when *D. deserti* IrrE and DdrO were highly co-expressed in the heterologous host *E. coli*, DdrO cleavage occurred in the absence of any inducing treatment (Ludanyi *et al.*, 2014).

Interestingly, 16 different insertions generating constitutive expression of the *ddrB::lacZ* fusion were located in genes encoding the E1 or E2 subunits of the α -KGDH, a key regulatory enzyme of the Krebs cycle, underlying the importance of this enzyme in activation of the RDR response in *D. radiodurans*. KGDH catalyzes the reaction converting α -keto-glutarate to succinyl-CoA. KGDH is

sensitive to reactive oxygen species (ROS) (Tretter and Adam-Vizi, 2005). It was proposed that the E2 subunit of KGDH would be a sensor of the intracellular oxidative state of the cell (Mailloux *et al.*, 2007; 2009). The oxidation of the E2 subunit of KGDH probably decreases its activity, resulting in the increase of the pool of α -keto-glutarate, a scavenger of ROS. We propose that the oxidative stressed state of the cell might influence the activity of the IrrE protein.

As previously observed in *D. deserti* (Ludanyi *et al.*, 2014), the failure to obtain a homozygous *ddrO* knockout mutant in *D. radiodurans* suggests the essentiality of this gene. In this study, using a conditional gene inactivation system, we proved that DdrO is essential for cell viability (Fig. 4). After depletion of DdrO, cells showed many defects, in particular DNA condensation, DNA degradation and formation of small vesicles (Figs 8 and 9). These phenotypes are the hallmarks of apoptotic bacterial cells (for review, see Bayles, 2014). In *E. coli*, ALD was shown to be a RecA-LexA mediated pathway that occurs only under conditions of severe DNA damage, suggesting that DNA damage response involves two opposite outcomes: life mediated by the early induction of SOS genes and death mediated by induction of numerous additional genes, some of them being controlled by LexA (Erental *et al.*, 2014). In *Caulobacter crescentus*, ALD results from the action of the LexA-controlled endonuclease BapE whose overproduction was shown to be necessary and sufficient to induce ALD in this bacterium (Bos *et al.*, 2012). Here, we showed by pulsed-field gel electrophoresis that depletion of DdrO induced genome fragmentation, suggesting that expression or activity of an unknown nuclease can be controlled by DdrO. In *E. coli*, SOS constitutive mutants are viable only in a *sfia*⁻ background (Huisman *et al.*, 1980). SfiA binds directly to FtsZ, a protein involved in septal biogenesis (Cordell *et al.*, 2003). The expression of the *sfia* (or *sulA*) gene is induced during the SOS response but only transiently during the recovery process, in order to avoid lethal inhibition of cell division (Trusca *et al.*, 1998). No *sfia* homolog is present in the *D. radiodurans* genome. Nevertheless, *D. radiodurans* might encode, under the control of DdrO, a damage-inducible functional analog of SfiA that might transiently inhibit cell division and give time for the recovery processes to take place before the restart of cell division.

Here, we showed that the DdrO repressor is an essential gene, probably because it controls the expression of one or more pro-apoptotic genes channelling cells to death. We can imagine that these pro-apoptotic genes are tightly repressed by DdrO and induced at late times if DNA damage are not rapidly repaired. This hypothesis is in agreement with previous results where we showed that limiting cell concentrations of RecA protein resulted in a delay in mending DNA double-strand breaks in cells

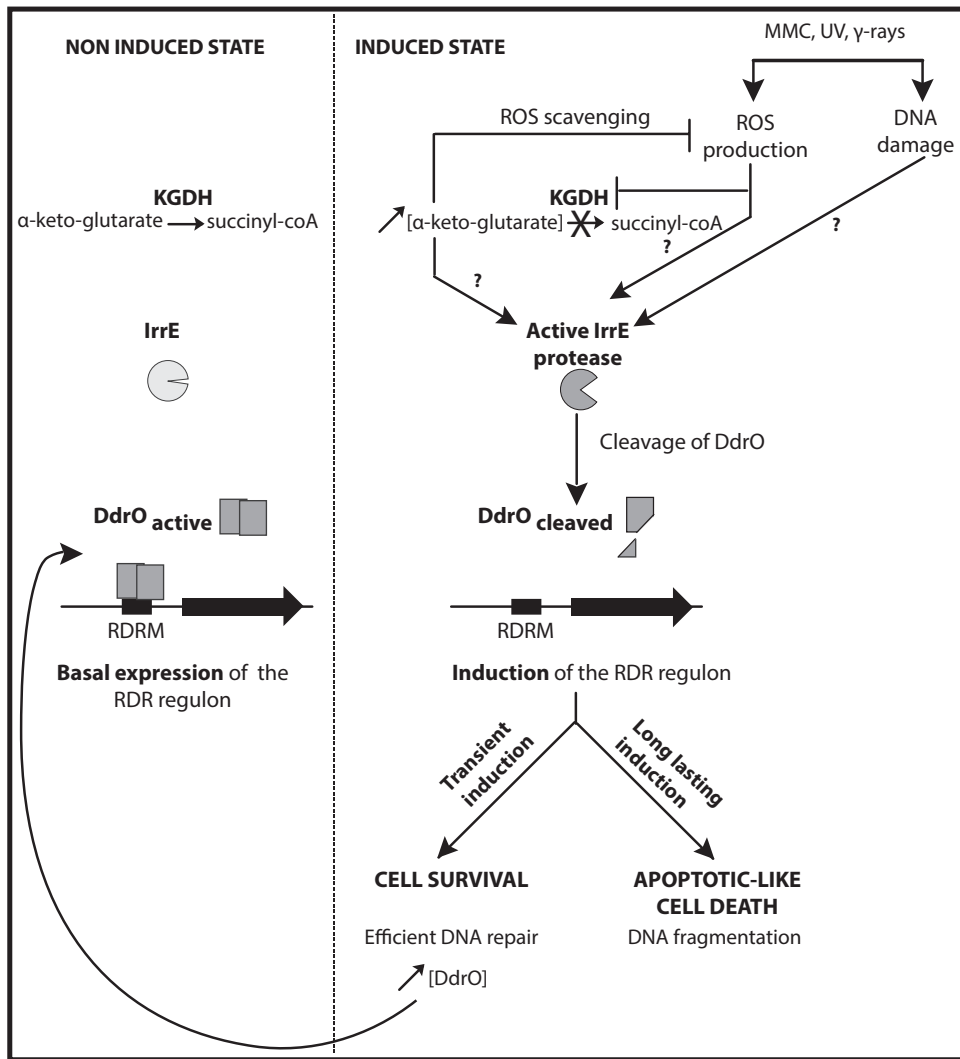


Fig. 10. Model for the regulation of the RDR regulon.

exposed to γ -irradiation, and thus bacteria will be committed to die during the post-irradiation incubation (Jolivet *et al.*, 2006).

Our results are compatible with a scenario (Fig. 10) in which, at early times after irradiation, DdrO is subjected to proteolytic degradation by an activated form of IrrE, resulting in a drop of the DdrO protein level and the derepression of the RDR regulon. We propose that when DNA repair is completed and/or when the oxidative stressed state of the cells returns to a pre-irradiation state, the proteolytic activity of IrrE decreases so that the DdrO protein, no longer cleaved, can accumulate to again repress the RDR regulon and restore the pre-irradiation unstressed steady state of the cell. We also propose that long-lasting activation of the IrrE protease, resulting in prolonged decreased concentrations of DdrO, might be sufficient to direct the cells to an apoptotic-like death pathway. As in eukaryotes or in the model bacteria *E. coli*,

DNA repair and apoptotic-like death in *D. radiodurans* might be two responses, both mediated by the same regulators (IrrE and DdrO proteins) but activated under different conditions depending on the persistence of DNA damage or another signal resulting in the activation of the IrrE protease activity in the cells. Our results suggest that IrrE and DdrO regulators modulate the graded expression of genes involved at the crossroads of DNA repair, cell cycle arrest and programmed cell death in the radioresistant *D. radiodurans* bacterium.

Experimental procedures

Bacterial strains, media

The bacterial strains used here are listed in Table 2. The *E. coli* strains used were DH5 α as the general cloning host, and SCS110 to propagate plasmids prior to introduction into *D. radiodurans* via transformation (Meima *et al.*, 2001). All

Table 2. Bacterial strains used in this study.

Bacterial strains	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
SCS110	<i>endA dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) (F'traD36 proAB lac⁺ZΔM15)</i>	Laboratory stock
<i>D. radiodurans</i>		
R1	ATCC 13939, reference wild type strain	Laboratory stock
GY12251	$\Delta pprA\Omega cat$	Devigne <i>et al.</i> , 2013
GY12830	<i>ddrB::spaΩcat</i>	Bouthier de la Tour <i>et al.</i> (2011)
GY13338	<i>gyrA::spaΩcat</i>	Touelle <i>et al.</i> (2012)
GY 13747	R1/p13841	This work
GY13771	$\Delta amyE\Omega P_{tufA}::lacI-kan/p13849$ (<i>prepUTs::amyE</i>)	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
GY13785	R1/p11554	This work
GY13795	$\Delta hbs\Omega cat/p13863$ (<i>prepUTs::hbs</i>)	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
GY14125	Non homogenotized $\Delta ddrO\Omega cat$	This work
GY14126	Non homogenotized $\Delta ddrO\Omega kan$	This work
GY14127	$\Delta irrE\Omega kan$	This work
GY14164	$\Delta ddrO\Omega cat/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY14165	$\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY14166	$\Delta ddrO\Omega hph/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY14310	$\Delta (IS_{Dra2F})\Omega tetA\Omega (P_{mpA}::lacZ\Omega cat)$	Pasternak <i>et al.</i> (2010)
GY14629	<i>pprA::flagΩcat</i>	This work
GY15505	<i>amyEΩ(P_{tufA}::lacI kan) ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion	This work
GY15511	$\Delta crtI\Omega(P_{ddrB}::lacZ\Omega cat)$ transcriptional fusion	This work
GY15512	$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ translational fusion	This work
GY15515	$\Delta irrE\Omega hph\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ translational fusion	This work
GY15570	<i>pprA::flagΩcat ΔddrOΩkan/p11891</i> (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY15572	<i>gyrA::spaΩcat ΔddrOΩkan/p11891</i> (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY15574	<i>ddrB::spaΩcat ΔddrOΩkan/p11891</i> (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>)	This work
GY15576	$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ (RDRM-1 mutation) translational fusion	This work
GY15577	$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ (RDRM-2 mutation) translational fusion	This work
GY15579	$\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ (RDRM-3 mutation) translational fusion	This work
GY15580	<i>Tn5-irrEΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion	This work
GY15581	<i>ddrOΩhph(Tn5, position 2576818) ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion – clone 1	This work
GY15582	<i>ddrOΩhph(Tn5, position 2576755) ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion – clone 2	This work
GY16173	<i>ddrO::flagΩcat</i>	This work
GY16177	<i>ddrO::flagΩcat ΔirrEΩkan</i>	This work
GY16474	$\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>) $\Delta crtI\Omega(P_{ddrB}::lacZ\Omega cat)$ transcriptional fusion	This work
GY16476	$\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>) $\Delta crtI\Omega(ddrB::lacZ\Omega cat)$ translational fusion	This work
GY16478	$\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>) $\Delta crtI\Omega(P_{gyrA}::lacZ\Omega cat)$ transcriptional fusion	This work
GY16480	$\Delta ddrO\Omega kan/p11891$ (<i>prepUTs::ddrO⁺</i>) $\Delta (IS_{Dra2F})\Omega tetA\Omega (P_{mpA}::lacZ\Omega cat)$ transcriptional fusion	This work

D. radiodurans strains were derivatives of strain R1 ATCC 13939. *D. radiodurans* strains were grown at 30°C in TGY2x (1% Tryptone, 0.2% dextrose, 0.6% Yeast Extract) or plated on TGY containing 1.5% agar, and *E. coli* strains were grown at 37°C in Lysogeny Broth (LB). When necessary, media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following final concentrations: hygromycin 50 μg ml⁻¹, kanamycin 6 μg ml⁻¹, chloramphenicol 3 μg ml⁻¹, spectinomycin 75 μg ml⁻¹ for *D. radiodurans*; and spectinomycin 40 μg ml⁻¹, ampicillin 100 μg ml⁻¹ for *E. coli*.

Alleles $\Delta ddrO\Omega cat$, $\Delta ddrO\Omega kan$, $\Delta ddrO\Omega hph$, $\Delta crtI\Omega(P_{ddrB}::lacZ\Omega cat)$, $\Delta crtI\Omega(P_{gyrA}::lacZ\Omega cat)$, $\Delta irrE\Omega kan$, $\Delta irrE\Omega hph$, *pprA::flagΩcat*, *ddrO::flagΩcat* were constructed by the tripartite ligation method (Mennecier *et al.*, 2004). Transformation of *D. radiodurans* with PCR products, genomic DNA or plasmids was performed as previously described (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011). The cassettes used for allelic replacement of genes and the mini transposon used for the construction of the insertion mutant library did not contain transcription termination sites to limit polar effect on

the expression of genes located downstream of the sites of their insertions. The genetic structure and the purity of the mutants were checked by PCR. Oligonucleotides used for strain construction and diagnostic PCR will be provided on request.

Plasmid constructions

The plasmids used in this study are listed in Table 3. Plasmid p13027 is a derivative of pUC18 carrying a promoterless *lacZ* gene and was used for the construction of the translational *ddrB::lacZ* fusion by inserting the *ddrB* promoter between *Acc651/NcoI* sites to obtain p13033. Plasmid p13025 is a derivative of pUC18 carrying a promoterless *lacZ* gene coming from pRADZ1 (Meima and Lidstrom, 2000) and was used for the construction of transcriptional fusions. A PCR fragment of *gyrA* (308 bp) and *ddrB* (323 bp) promoters were inserted between *Acc651/BglII* sites of p13025 to obtain p13036 and p13028 respectively. RDRM point mutations

Table 3. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source or reference
pGTC101	Source of chloramphenicol cassette	Earl <i>et al.</i> (2002b)
pRADZ1	Source of <i>lacZ</i> coding sequence	Meima and Lidstrom (2000)
pUC18	Amp ^R in <i>E. coli</i>	Laboratory stock
p11086	Source of kanamycin cassette in <i>D. radiodurans</i>	Laboratory stock
p11891	p13841: <i>prepUTs::ddrO</i>	This work
p13025	pUC18 <i>SmaI/XbaI</i> + fragment <i>NruI/XbaI</i> encoding <i>lacZ</i> from pRADZ1	This work
p13027	pU18 <i>Sall/BamHI</i> + PCR fragment encoding <i>lacZ</i> (<i>Sall/BamHI</i>)	This work
p13028	p13025 <i>Acc65I/BglII</i> + PCR fragment containing P _{<i>ddrB</i>} (transcriptional fusion)	This work
p13033	p13027 <i>Acc65I/NcoI</i> + PCR fragment containing P _{<i>ddrB</i>} (translational fusion)	This work
p13036	p13025 <i>Acc65I/BglII</i> + PCR fragment containing P _{<i>gyrA</i>} (transcriptional fusion)	This work
p13045	As p13033 but mutated in RDRM (mutation RDRM-1)	This work
p13046	As p13033 but mutated in RDRM (mutation RDRM-2)	This work
p13047	As p13033 but mutated in RDRM (mutation RDRM-3)	This work
p13554	Mini-Tn5 delivery plasmid in <i>D. radiodurans</i> , Spec ^R , Hyg ^R	Dulermo <i>et al.</i> (2015)
p13841	Vector thermosensitive for replication in <i>D. radiodurans</i> , Spec ^R , <i>prepUTs</i> , P _{<i>Spac</i>} -term116	Nguyen <i>et al.</i> (2009)

were introduced by site-directed mutagenesis (Agilent Technologies) in plasmid p13033, giving rise to plasmids p13045, p13046 and p13047. To construct plasmid p11891 used for conditional expression of *ddrO*, the *ddrO* gene was amplified by PCR and the PCR product was cloned into the thermosensitive plasmid p13841 (Nguyen *et al.*, 2009) between the *NdeI/XhoI* sites. Oligonucleotides used for plasmid construction will be provided upon request. All constructions were verified by DNA sequencing.

DNA manipulations

Plasmid DNA was extracted from *E. coli* using the NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Chromosomal DNA of *D. radiodurans* was extracted as previously described (Norais *et al.*, 2013). PCR reactions were performed using Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) or Go Taq DNA polymerase (Promega).

Mutagenesis using mini-Tn5 and isolation of mutants deregulated for *ddrB* expression

The mini-Tn5 delivery vector p13554 (Dulermo *et al.*, 2015) was used for transposon mutagenesis. This plasmid contains an origin of replication in *E. coli*, a mutated *repU* gene encoding thermosensitive RepU protein generating the loss of the plasmid at 37°C in *D. radiodurans* (Nguyen *et al.*, 2009), a gene conferring spectinomycin resistance (in *E. coli* and *D. radiodurans*), a gene encoding the Tn5 transposase under the control of a P_{*Spac*} promoter repressed by *lacI* and a mini-Tn5 transposon conferring hygromycin resistance. To generate stable insertions in the target DNA, the transposase gene has been cloned outside the mobile element. Plasmid p13554 was introduced into *D. radiodurans* GY15505 at 30°C using spectinomycin and hygromycin selection. This strain contains the *lacI* gene in the non-essential gene *amyE* to repress the expression of the transposase to avoid toxicity due to overproduction of the Tn5 transposase. Single transformant colonies were used to inoculate 10 independent cultures in 3 ml of TGY2x containing spectinomycin at 30°C. After 5 h of growth, the temperature was shifted from 30°C to

37°C, and incubation was maintained for 2 h at 37°C. This procedure yields a transposition frequency of approximately 1×10^{-2} (insertion mutants/viable cell). Appropriate dilutions of these cultures were spread onto TGY plates containing 50 µg ml⁻¹ of hygromycin, 40 µg ml⁻¹ of X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside), and with (20 ng ml⁻¹ or 40 ng ml⁻¹) or without mitomycin. Petri plates were incubated 72 h at 37°C and colonies were screened for deregulated expression of the *ddrB::lacZ* translational reporter fusion.

Mapping Tn5 insertions sites into *D. radiodurans* genome

The chromosomal region targeted by the transposon was determined by the arbitrary-primed (AP)-PCR procedure (Ton-Hoang *et al.*, 2010). The first PCR round was performed in a final volume of 50 µL with 50 ng genomic DNA. The arbitrary primer (ARB1c) was paired either with a primer specific for the 5' end of the mini-Tn5 (Tn5-212) or for the 3' end of the mini-Tn5 (Tn5-991), both at a final concentration of 0.8 µM and the first round of PCR was performed as follows: 2 min 95°C, 6 cycles of 45 s 95°C, 45 s 30°C, 1 min 30 s 72°C; 30 cycles of 45 s 95°C, 45 s 45°C, 2 min 72°C; and finally 72°C for 5 min. The second round was performed in a final volume of 50 µL, with 5 µL of the purified PCR product from round 1 as template; a second arbitrary primer (ARB3) was paired with either the Tn5-166 primer (5' end of Tn5) or with the Tn5-1055 primer (3' end of Tn5), each at a final concentration of 0.8 µM and the second round of PCR was performed as follows: 2 min 95°C; 30 cycles of 45 s 95°C, 45 s 52°C, 2 min 72°C; 72°C for 5 min. The products of this PCR were purified and sequenced with the SeqRE primer (5' end of Tn5) or with the EB89 primer (3' end of Tn5) by Cogenics (Meylan, France). The sequence of oligonucleotides ARB1c, Tn5-991, Tn5-212, Tn5-166, ARB3, EB89 and SeqRE will be provided upon request.

γ-irradiation treatment of *D. radiodurans*

Exponential cultures, grown in TGY2x, were concentrated to an A_{650 nm} = 20 in TGY2x and irradiated on ice with a ¹³⁷Cs

irradiation system (Institut Curie, Orsay or Paris, France). Following irradiation, cultures were diluted in TGY2x to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C.

β-galactosidase assay

Non-irradiated or irradiated (3.8 kGy) cultures were diluted in TGY2x to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C. At different post-irradiation times, 1 ml of culture was centrifuged. The cell pellets were resuspended in 100 μL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) and incubated in ice for 10 min. β-galactosidase activity was measured using the method of Miller (1992) on extracts prepared by Triton treatment. This assay was also performed on cells treated with 600 ng ml⁻¹ of mitomycin C. For this purpose, MMC was added to exponential cultures ($0.2 < A_{650\text{nm}} < 0.5$), grown in TGY2x, and 1 ml samples of cultures were taken at different times after addition of MMC and centrifuged prior to being assayed for β-galactosidase activity.

Western blot analysis

Non-irradiated or irradiated (3.8 kGy) cultures were diluted in TGY2x to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C. At different post-irradiation times, 20 ml of cultures was centrifuged. The pellets were resuspended in 150 μl of SSC1X buffer and the cells were disrupted as described previously (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). After centrifugation, the protein concentration was measured (Bio-Rad protein assay dye reagent) and amounts corresponding to 5 μg of proteins were subjected to electrophoresis through a 12% Glycine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) or a 16% Tricine SDS-PAGE. The proteins were transferred onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. The membrane was blocked with Tris Buffer Saline (TBS) containing 5% (w/v) powdered milk plus 0.05% Tween 20, prior to being incubated overnight at 4°C with a 1:5000 dilution of monoclonal mouse anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich) or 1:2000 anti-PprA chicken antibodies (a kind gift of M. Cox) in TBS containing 3% (w/v) powdered milk plus 0.05% Tween 20. After extensive washes in TBS-0.05% Tween 20, the membrane was incubated with anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Promega) or anti-chicken IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) used as secondary antibody and revealed by a colorimetric reaction.

DdrO depletion

ΔddrO strains complemented by *ddrO* expressed from a plasmid with thermosensitive replication (*prepUTs*) were grown at permissive temperature (30°C) with selective antibiotics for *ΔddrO* and plasmid maintenance, until they reached an A_{650} 0.25–0.3. Cells were harvested by centrifugation and resuspended at the previous A_{650} levels in fresh medium with antibiotics for selection of *ΔddrO* and grown at permissive (30°C) or non-permissive (37°C) temperature. The proportion of cells carrying the *prepUTs* plasmid was reduced to approximately 0.1% after 8 h at 37°C (Nguyen *et al.*, 2009). At 8 h, 16 h and 24 h, aliquots were removed for further analyses.

Fluorescence microscopy

DNA and membranes of cells were stained by incubation for 10 min at room temperature with DAPI (40 μg ml⁻¹) and FM4-64 (50 μg ml⁻¹), respectively, and spotted on a thin layer of TGY2x agarose 1% for microscopy observation. The stained cells were observed using a Leica DMIRE2 microscope. Eleven planes Z-stacks with Z-steps of 0.2 μm were captured with a CCD cool SNAP HQ2 camera (Roper Instruments). The final images were obtained by maximum Z-projection of the stacks with the Metamorph software (Universal Imaging Corp).

Pulsed-field gel electrophoresis

Culture aliquots (2 × 10⁸ cells) were removed to prepare DNA plugs as described previously (Harris *et al.*, 2004). The embedded cell plugs were lysed, treated with *NotI* restriction enzyme and subjected to pulsed-field gel electrophoresis as described previously (Lecoite *et al.*, 2004).

Acknowledgements

We thank Adriana Bailone and Michael DuBow for critical reading of the manuscript; Michael DuBow for polishing our English; Fabien Culot and Yannick Saberazana for their technical help; and the Institut Curie for the use of the ¹³⁷Cs irradiation system. We thank Michael Cox for the gift of anti-PprA antibodies. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud, Electricité de France (RB2007-11 to SS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV3-01701 to SS).

References

- Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 1126–1145.
- Bayles, K.W. (2014) Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. *Nat Rev Microbiol* **12**: 63–69.
- Blasius, M., Hubscher, U., and Sommer, S. (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 221–238.
- Bonacossa de Almeida, C., Coste, G., Sommer, S., and Bailone, A. (2002) Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. *Mol Genet Genomics* **268**: 28–41.
- Bos, J., Yakhnina, A.A., and Gitai, Z. (2012) BapE DNA endonuclease induces an apoptotic-like response to DNA damage in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 18096–18101.
- Bouthier de la Tour, C., Toueille, M., Jolivet, E., Nguyen, H.H., Servant, P., Vannier, F., and Sommer, S. (2009) The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. *Extremophiles* **13**: 827–837.
- Bouthier de la Tour, C., Boisnard, S., Norais, C., Toueille, M., Bentchikou, E., Vannier, F., *et al.* (2011) The deinococcal DdrB protein is involved in an early step of DNA double strand break repair and in plasmid transformation through

- its single-strand annealing activity. *DNA Repair (Amst)* **10**: 1223–1231.
- Cordell, S.C., Robinson, E.J., and Lowe, J. (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7889–7894.
- Daly, M.J. (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* **7**: 237–245.
- Devigne, A., Mersaoui, S., Bouthier-de-la-Tour, C., Sommer, S., and Servant, P. (2013) The PprA protein is required for accurate cell division of gamma-irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *DNA Repair (Amst)* **12**: 265–272.
- Dulermo, R., Onodera, T., Coste, G., Passot, F., Dutertre, M., Porteron, M., et al. (2015) Identification of new genes contributing to the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* using a Tn5-based transposon mutant library. *PLoS ONE*. In Press. doi: 10.1371/journal.pone.0124358.
- Earl, A.M., Mohundro, M.M., Mian, I.S., and Battista, J.R. (2002a) The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J Bacteriol* **184**: 6216–6224.
- Earl, A.M., Rankin, S.K., Kim, K.P., Lamendola, O.N., and Battista, J.R. (2002b) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J Bacteriol* **184**: 1003–1009.
- Erental, A., Kalderon, Z., Saada, A., Smith, Y., and Engelberg-Kulka, H. (2014) Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *mBio* **5**: e01426-01414.
- Erill, I., Campoy, S., and Barbe, J. (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 637–656.
- Gao, G., Le, D., Huang, L., Lu, H., Narumi, I., and Hua, Y. (2006) Internal promoter characterization and expression of the *Deinococcus radiodurans* *ppl-folP* gene cluster. *FEMS Microbiol Lett* **257**: 195–201.
- de Groot, A., Dulermo, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guerin, P., Fernandez, B., et al. (2009) Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet* **5**: e1000434.
- Harris, D.R., Tanaka, M., Saveliev, S.V., Jolivet, E., Earl, A.M., Cox, M.M., and Battista, J.R. (2004) Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol* **2**: e304.
- Hua, Y., Narumi, I., Gao, G., Tian, B., Satoh, K., Kitayama, S., and Shen, B. (2003) PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 354–360.
- Huisman, O., Ari, R.D., and George, J. (1980) Dissociation of *tsl-tif*-induced filamentation and RecA protein synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **142**: 819–828.
- Jolivet, E., Lecointe, F., Coste, G., Satoh, K., Narumi, I., Bailone, A., and Sommer, S. (2006) Limited concentration of RecA delays DNA double-strand break repair in *Deinococcus radiodurans* R1. *Mol Microbiol* **59**: 338–349.
- Kreuzer, K.N. (2013) DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a012674.
- Lecointe, F., I., Shevelev, V., Bailone, A., Sommer, S., and Hubscher, U. (2004) Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* **53**: 1721–1730.
- Liu, Y., Zhou, J., Omelchenko, M.V., Beliaev, A.S., Venkateswaran, A., Stair, J., et al. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4191–4196.
- Lu, H., Gao, G., Xu, G., Fan, L., Yin, L., Shen, B., and Hua, Y. (2009) *Deinococcus radiodurans* PprI switches on DNA damage response and cellular survival networks after radiation damage. *Mol Cell Proteomics* **8**: 481–494.
- Ludanyi, M., Blanchard, L., Dulermo, R., Brandelet, G., Bellanger, L., Pignol, D., et al. (2014) Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol Microbiol* **94**: 434–449.
- Mailloux, R.J., Beriault, R., Lemire, J., Singh, R., Chenier, D.R., Hamel, R.D., and Appanna, V.D. (2007) The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE* **2**: e690.
- Mailloux, R.J., Singh, R., Brewer, G., Auger, C., Lemire, J., and Appanna, V.D. (2009) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant alpha-ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **191**: 3804–3810.
- Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., et al. (2007) *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS ONE* **2**: e955.
- Meima, R., and Lidstrom, M.E. (2000) Characterization of the minimal replicon of a cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia coli*-*D. radiodurans* shuttle vectors. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3856–3867.
- Meima, R., Rothfuss, H.M., Gewin, L., and Lidstrom, M.E. (2001) Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* **183**: 3169–3175.
- Mennecier, S., Coste, G., Servant, P., Bailone, A., and Sommer, S. (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Genet Genomics* **272**: 460–469.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Narumi, I., Satoh, K., Kikuchi, M., Funayama, T., Yanagisawa, T., Kobayashi, Y., et al. (2001) The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation. *J Bacteriol* **183**: 6951–6956.
- Nguyen, H.H., de la Tour, C.B., Touelle, M., Vannier, F., Sommer, S., and Servant, P. (2009) The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Mol Microbiol* **73**: 240–252.
- Norais, C., Servant, P., Bouthier-de-la-Tour, C., Coureux, P.D., Ithurbide, S., Vannier, F., et al. (2013) The *Deinococcus radiodurans* DR1245 protein, a DdrB partner homologous to YbjN proteins and reminiscent of type III secretion system chaperones. *PLoS ONE* **8**: e56558.
- Norais, C.A., Chitteni-Pattu, S., Wood, E.A., Inman, R.B., and Cox, M.M. (2009) DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *J Biol Chem* **284**: 21402–21411.

- Pasternak, C., Ton-Hoang, B., Coste, G., Bailone, A., Chandler, M., and Sommer, S. (2010) Irradiation-induced *Deinococcus radiodurans* genome fragmentation triggers transposition of a single resident insertion sequence. *PLoS Genet* **6**: e1000799.
- Satoh, K., Ohba, H., Sghaier, H., and Narumi, I. (2006) Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* **152**: 3217–3226.
- Slade, D., and Radman, M. (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 133–191.
- Solovyev, V., and Salamov, A. (2011) Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Li, R.W. (ed.). Agriculture Research Service, USA: Nova Science Publishers, pp. 61–78.
- Tanaka, M., Earl, A.M., Howell, H.A., Park, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S.N., and Battista, J.R. (2004) Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics* **168**: 21–33.
- Ton-Hoang, B., Pasternak, C., Siguier, P., Guynet, C., Hickman, A.B., Dyda, F., *et al.* (2010) Single-stranded DNA transposition is coupled to host replication. *Cell* **142**: 398–408.
- Toueille, M., Mirabella, B., Guerin, P., Bouthier de la Tour, C., Boisnard, S., Nguyen, H.H., *et al.* (2012) A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J Proteomics* **75**: 2588–2600.
- Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 2335–2345.
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., and Bramhill, D. (1998) Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol* **180**: 3946–3953.
- Vujcic-Zagar, A., Dulermo, R., Le Gorrec, M., Vannier, F., Servant, P., Sommer, S., *et al.* (2009) Crystal structure of the IrrE protein, a central regulator of DNA damage repair in deinococcaceae. *J Mol Biol* **386**: 704–716.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Supplementary Information for “DdrO Is an Essential Protein that Regulates the Radiation Desiccation Response and the Apoptotic-Like Cell Death in the Radioresistant *Deinococcus radiodurans* Bacterium”

Alice Devigne*, Solenne Ithurbide*, Claire Bouthier de la Tour, Fanny Passot, Martine Mathieu, Suzanne Sommer, and Pascale Servant**

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris Sud, Bâtiment 409, 91405 Orsay, France

* Co-first authors

** Corresponding author

Contents:

Fig. S1: Expression of a *ddrB::lacZ* reporter translational fusion after γ -irradiation.

Fig. S2: β -galactosidase expression from a *ddrB::lacZ* translational fusion in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates. FigS3

Fig. S3: Expression of PprA in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates. Fig S5

Fig. S4: Schematic representation and test of deletion-substitution in the *D. radiodurans ddrO* gene.

Fig. S5: Expression of a $P_{gyrA}::lacZ$ reporter transcriptional fusion after DdrO depletion

Fig. S6: Schematic representation and test of allelic replacements of *ddrO*⁺ by *ddro::flag* allele.

Table S1: chromosomal position of genes identified by screening of a mini-Tn5 library for mutants affected in the regulation of *ddrB::lacZ* translational fusion.

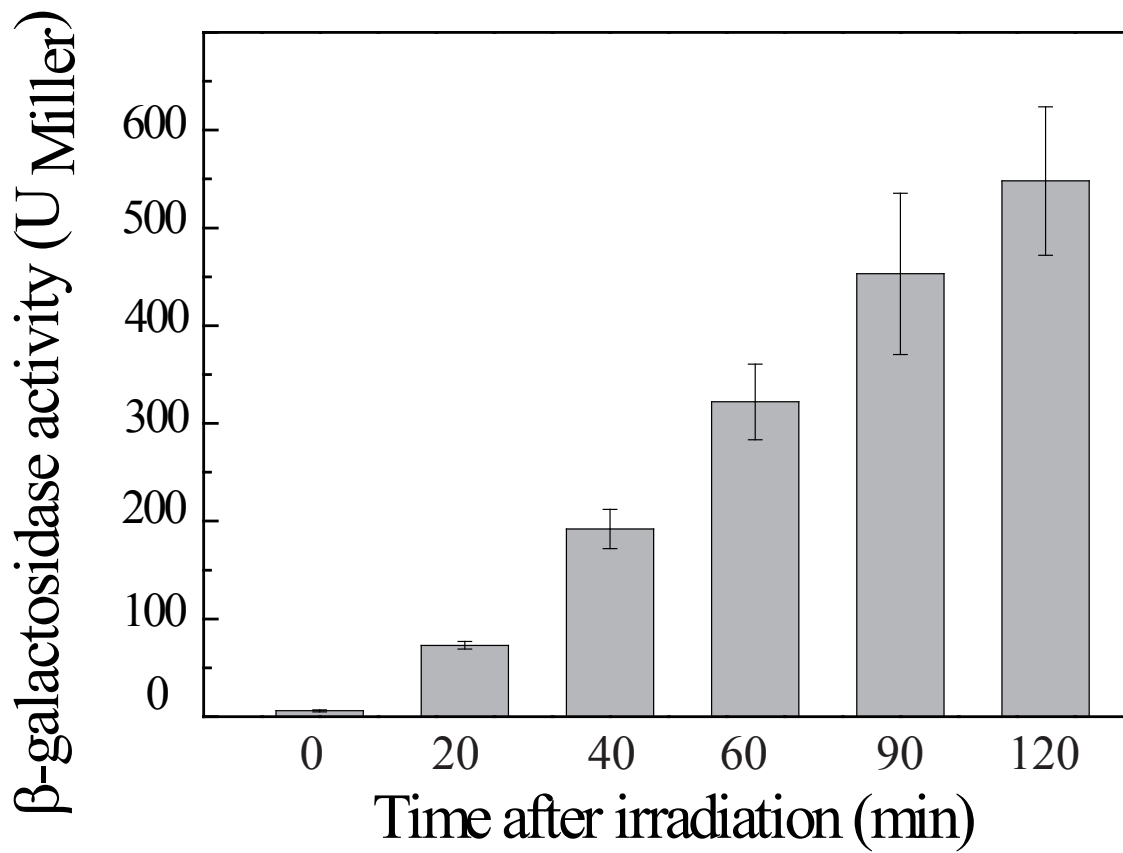


Fig. S1: Expression of a *ddrB::lacZ* reporter translational fusion after γ -irradiation.

D. radiodurans cells exposed to 3,8 kGy were incubated for the indicated time periods and β -galactosidase activity was measured as described in Materials and Methods. The results are the average of at least three independent experiments.

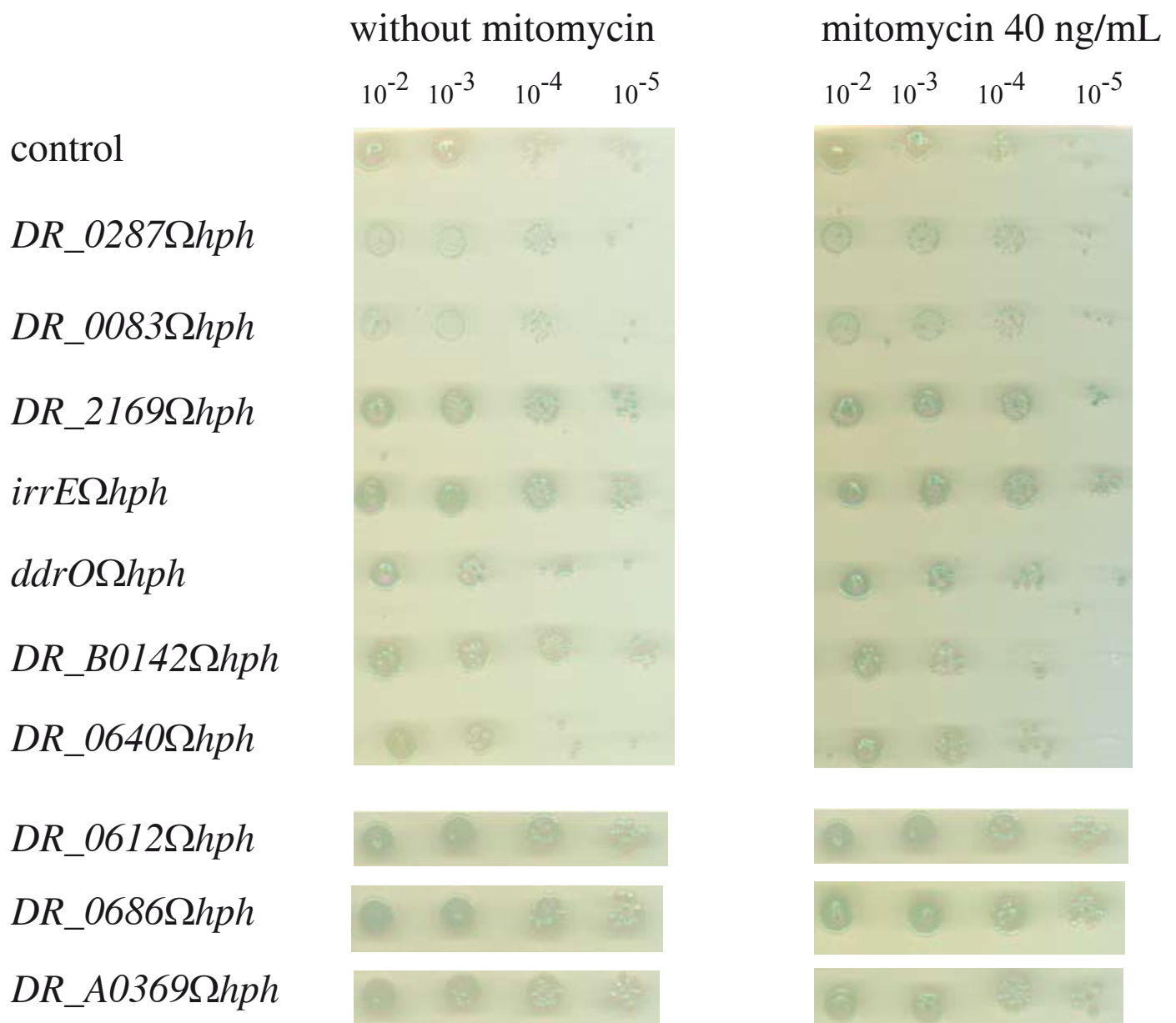


Fig. S2: β -galactosidase expression from a *ddrB::lacZ* translational fusion in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates.

Insertion mutant strains were grown in TGY2x medium containing hygromycin (50 μ g/mL) and dilutions were spotted on TGY medium containing X-Gal (40 μ g/mL) with (40 ng/mL) or without mitomycin.

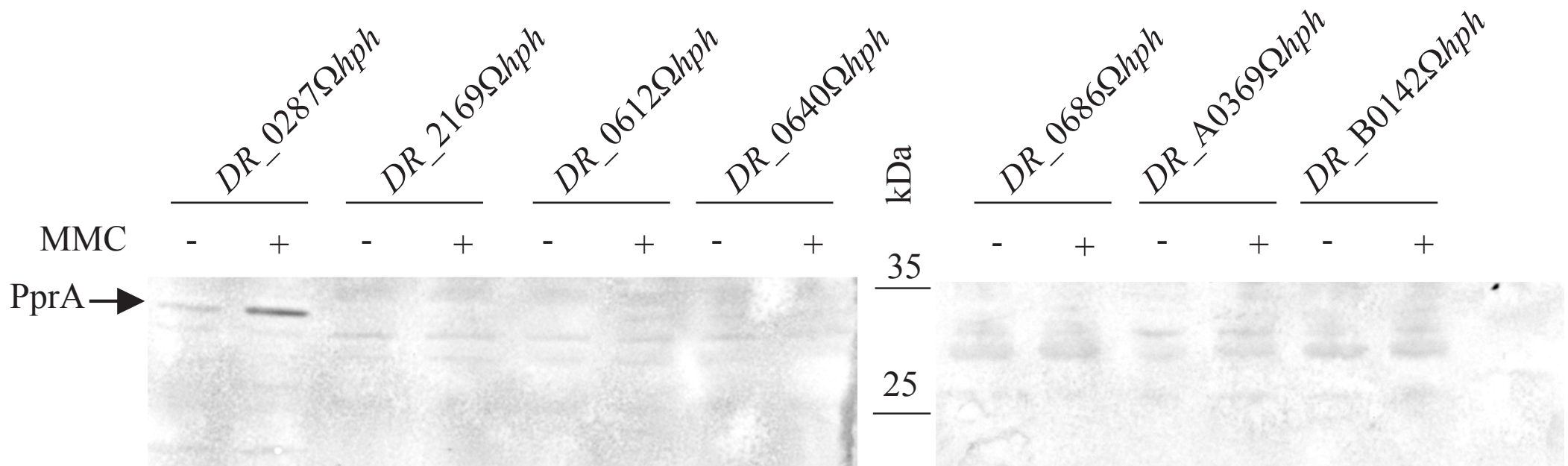


Fig. S3: Expression of PprA in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates.

Bacteria were grown on TGY plates with hygromycin containing MMC (80 ng/mL) or not for three days. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by western blot with anti-PprA antibodies. 5µg of protein were loaded on each well.

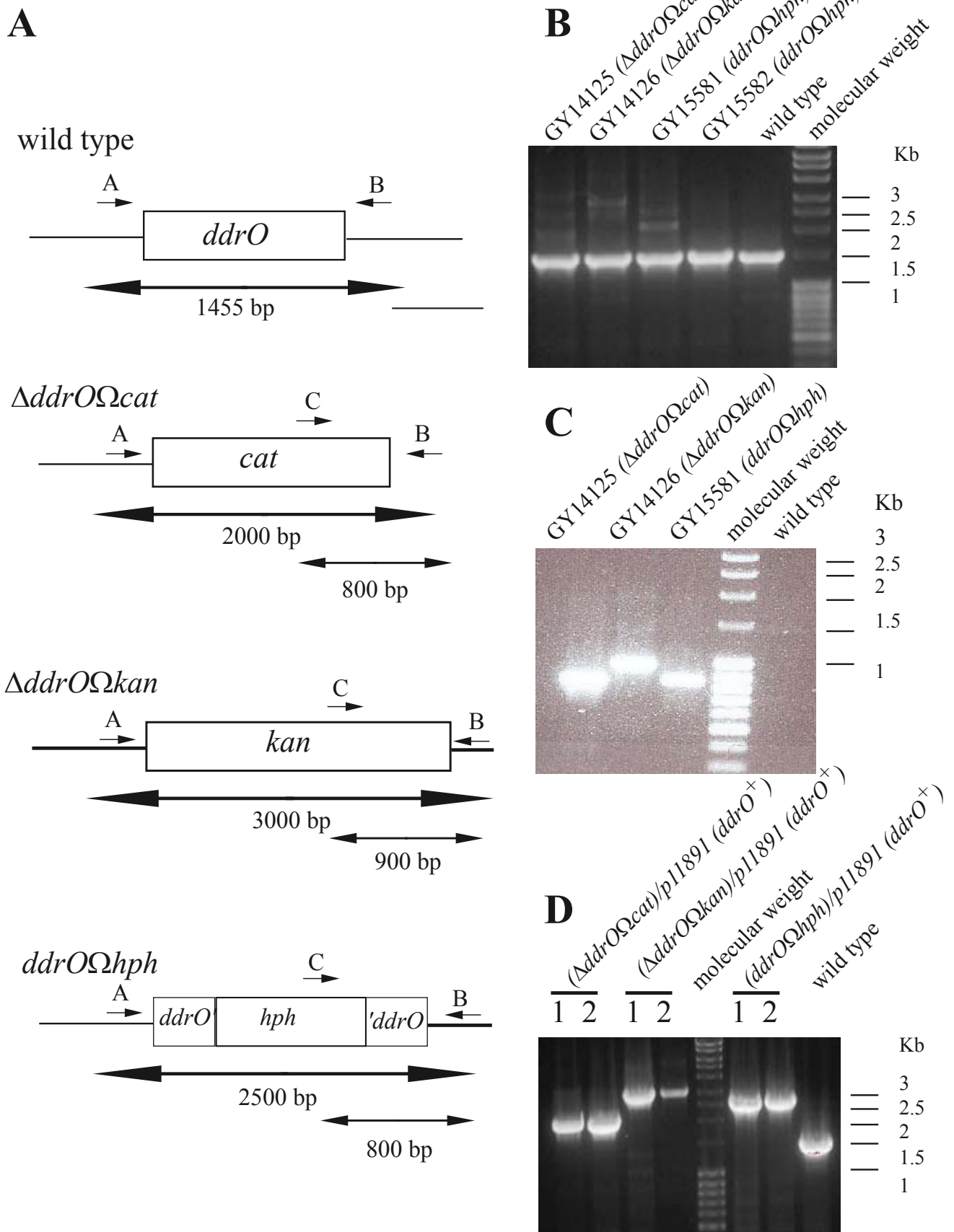


Fig. S4: Schematic representation and test of deletion-substitution in the *D. radiodurans ddrO* gene.

(A) Schematic representation of the allele replacement event in *ddrO* gene. Short arrows indicate the position of specific primers used for diagnostic PCR.

(B) Diagnostic PCR of independent candidate $\Delta ddrO$ mutants. Primers used: A and B

(C) Diagnostic PCR for cassette insertion in the *D. radiodurans ddrO* gene. Primers used: B and C

(D) Diagnostic PCR for homogenotization of independent $\Delta ddrO$ (*prepUTS-ddrO*⁺) mutants. Primers used: A and B

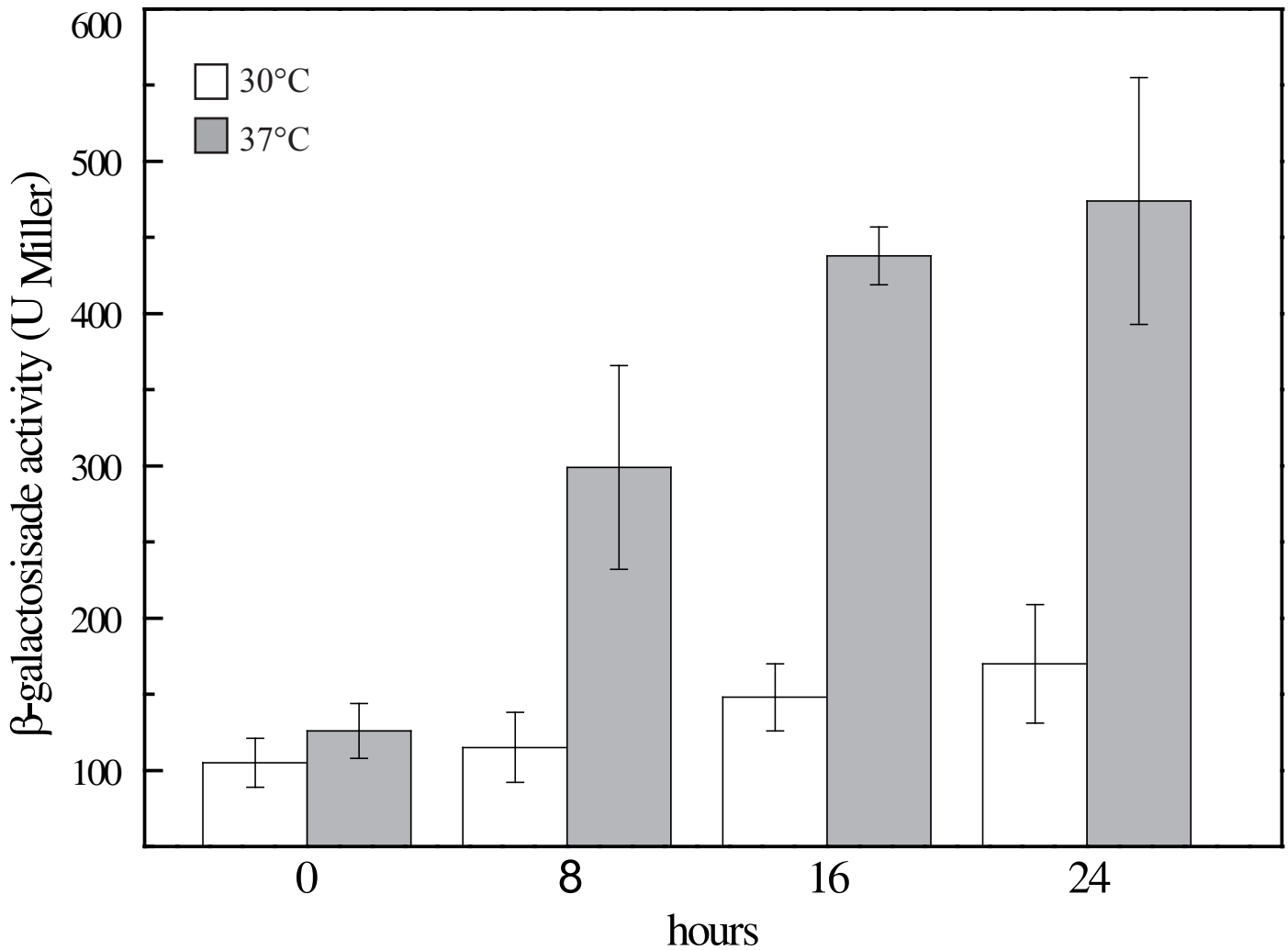


Fig. S5: Expression of a $P_{gyrA}::lacZ$ reporter transcriptional fusion after DdrO depletion

GY16478 [$\Delta crtIQ(P_{gyrA}::lacZ\Omega cat) \Delta ddrO\Omega kan/p11891(preUTs::ddrO^+)$] bacteria were grown to exponential phase ($A_{650nm} = 0.3$) at 30°C in medium supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C (white bars) or at 37°C (gray bars). β -galactosidase activity was measured as described in the Materials and Methods. The results are the average of at least three independent experiments.

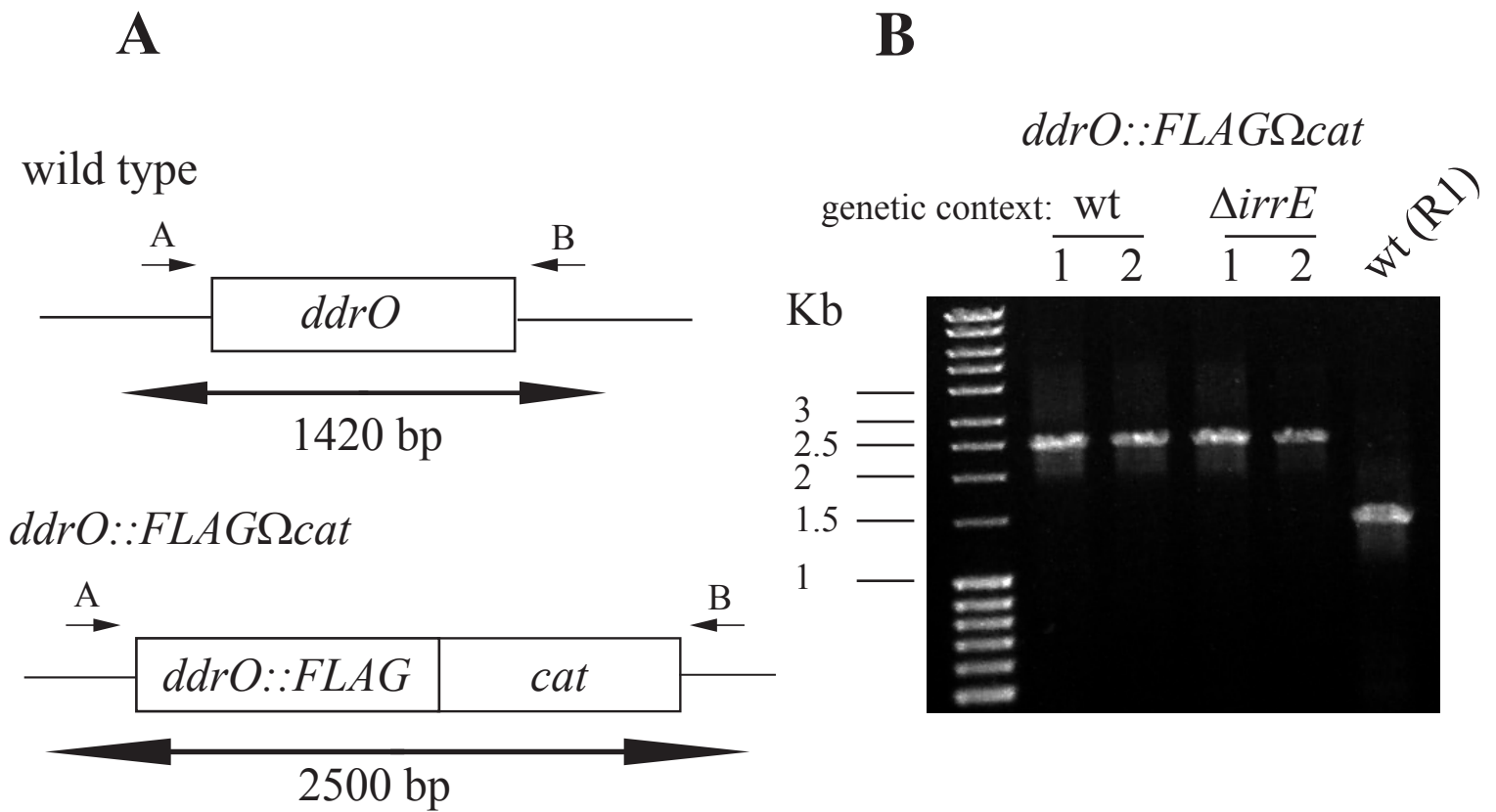


Fig. S6: Schematic representation and test of allelic replacements of $ddrO^+$ by *ddro::flag* allele.

(A) Schematic representation of the allele replacement event in *ddrO* gene. Short arrows indicate the position of specific primers used for diagnostic PCR.

(B) PCR diagnostic for homogenotization of independent *ddrO::flagΩcat* allele in wild type (wt) or $\Delta irrE$ mutants.

category/gene	chromosomal position	number of isolated clones on medium	
		without MMC	+ MMC
<i>upstream ddrB ::lacZ</i>	873647	3	4
	874042	1	
	874876	1	
	874009	1	
	874210	1	
	873721	1	
	874836		1
	874498		1
	873685		1
	874597		1
<i>DR_0287</i>	289830	2	5
	289364	1	1
	287640	1	
	290088	1	
	289763		1
	289825		1
<i>DR_0083</i>	84161	1	1
	84152		1
	83715		1
<i>DR_2574 (ddrO)</i>	2576818	1	
	2576755	1	
<i>DR_0167 (irrE)</i>	169958	1	
<i>DR_0612</i>	624118	1	
<i>DR_0640</i>	653573		1
<i>DR_2169</i>	2166088	1	
<i>DR_0686</i>	695873	1	
<i>DR_A0369</i>	410599		1
<i>DR_B0142</i>	171163	1	
	171505	1	

Table S1: chromosomal position of genes identified by screening of a mini-Tn5 library for mutants affected in the regulation of *ddrB::lacZ* translational fusion.

Positions of the insertions were determined according the published genome sequence by White et al [1].

Supplemental references

1. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. Science 286: 1571-1577.